

Über die Beeinflussung der Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität beim Huhn

Dipl. Oec. Troph. Chong-ja Chon geb. Sung

1974

Institut für Ernährungswissenschaft I
der Justus Liebig-Universität Gießen
und Institut für Ernährungsphysiologie der Ludwig
Maximilians-Universität München

ÜBER DIE BEEINFLUSSUNG DER KETOGLUTARAT-DEHYDROGENASE-

AKTIVITÄT BEIM HUHN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung der Doktorwürde
im Fachbereich Ernährungswissenschaften
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl. Oec. Troph. Chong-ja Chon geb. Sung
aus Seoul/Korea

1974



Dekan: Professor Dr. E. Menden

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. Dr. h. c. Dr. h. c.

J. Brüggemann

2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Feldheim

Tag der mündlichen Prüfung: 18. November 1974

Vorwort

Die vorliegende Arbeit, die "die Beeinflussung der Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität beim Huhn" untersucht, verdankt ihre Entstehung der Anregung und Initiative von Herrn Professor Dr. Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. J. Brüggemann, Vorstand des Instituts für Tierphysiologie und von dem verstorbenen Herrn Professor Dr. J. Tiews, Vorstand des Instituts für Ernährungsphysiologie der Ludwig Maximilians-Universität München.

Herrn Professor Dr. Brüggemann als meinem Doktorvater möchte ich meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. Cremer, Direktor des Instituts für Ernährungswissenschaft I der Justus Liebig-Universität Gießen und Herrn Prof. Dr. Feldheim danke ich besonders für ihr Entgegenkommen, diese Arbeit außerhalb ihres Instituts durchführen zu können und für ihre Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung des Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. Huth danke ich für sein Entgegenkommen.

Herrn Dr. Wittmann möchte ich besonders für seine zahlreichen Vorschläge, Ideen und Impulse, die meine Arbeit vorangetrieben haben, meinen großen Dank aussprechen.

Dem Bayerischen Staatsstipendium danke ich für die finanzielle Unterstützung, die einen Beitrag zu meinem Aufenthalt in Deutschland leistete.

Schließlich danke ich auch Frl. Martin für ihre Hilfe.

ABKÜRZUNGEN

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CoA	Coenzym A (für Acylaktivierung)
GDP	Guanosin-diphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
KDH	Ketoglutarat-Dehydrogenase
KGS	Ketoglutarsäure
NAD⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
P-Enzym	Phosphorylierendes Enzym = Succinat-Thiokinase
P_i	anorganisches Phosphat
TPP	Thiaminpyrophosphat

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. EINLEITUNG	1
1.1. <u>Entstehung von Ketoglutarat</u> <u>und dessen Bedeutung in der Zelle</u>	2
1.2. <u>Der katalytische Abbau</u> <u>von Ketoglutarat durch die KDH</u>	7
1.3. <u>Regulierung der KDH-Aktivität</u>	11
1.4. <u>Bedeutung des Citratzyklus</u>	15
1.5. <u>Regulierung des Citratzyklus</u>	16
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1. <u>Versuchstiere und ihre Haltung</u>	20
2.2. <u>Präparation der Homogenate</u>	20
2.3. <u>Bestimmung der KDH</u>	21
2.4. <u>Bestimmung des P-Enzyms</u>	23
2.5. <u>Reagentien</u>	25
3. ERGEBNISSE	27
3.1. <u>Vorversuche</u>	27
3.2. <u>Hauptversuche</u>	34
3.2.1. Veränderungen der KDH und des P-Enzyms während der Ontogenese	34
3.2.2. Einfluß des Futterentzuges auf die KDH- und P-Enzymaktivität	42
3.2.3. Einfluß von Glutamat auf die KDH- und P-Enzymaktivität	42
3.2.4. Hormonelle Beeinflussung der KDH und P-Enzyms	48
3.2.5. Einfluß der Narkose auf die KDH- und P-Enzymaktivität	53

4. DISKUSSION	55
4.1. <u>Die Veränderung der KDH und des P-Enzyms während der Ontogenese</u>	55
4.2. <u>Einfluß von Glutamat auf die Aktivität der KDH und des P-Enzyms</u>	58
4.3. <u>Einfluß des Futterentzuges auf die Aktivität der KDH und des P-Enzyms</u>	61
4.4. <u>Einfluß von Hormonen auf die Aktivität der KDH und des P-Enzyms</u>	62
4.5. <u>Einfluß der Narkose auf die Aktivität der KDH und P-Enzyms</u>	64
5. ZUSAMMENFASSUNG	65
6. LITERATURVERZEICHNIS	67

LEBENS LAUF

1. EINLEITUNG

Pyruvat-Dehydrogenase und Ketoglutarat-Dehydrogenase - im folgenden als KDH abgekürzt - sind Multienzymkomplexe, die sich in ihrem Aufbau und in ihrem katalytischen Reaktionsmechanismus weitgehend ähneln.

Neuere Untersuchungen haben darüber hinaus gezeigt, daß auch die Regulierung der Aktivität bei beiden Enzymen vergleichbaren Gesetzmäßigkeiten unterliegt.

Ein wesentlicher Unterschied in der Aktivitätskontrolle scheint jedoch in der Interconvertierung zu liegen, die bis jetzt bei der KDH nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Untersuchungen über die Regulierung der KDH erstreckten sich fast ausschließlich auf ein weitgehend gereinigtes Enzym.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte die Beeinflussung der KDH unter in vivo Bedingungen studiert werden. Als Versuchstier wurde das Haushuhn gewählt.

1.1. Entstehung von Ketoglutarat und dessen Bedeutung in der Zelle.

Ketoglutarat, das Substrat der KDH, entsteht in der Zelle durch Oxidation oder durch Transaminierung. Im Citratzyklus stellt Ketoglutarat das Oxidationsprodukt der Isocitrat-Dehydrogenase dar. Diese Reaktion wurde erstmals von OCHOA (54) entdeckt. Man kennt zwei Formen der Isocitrat-Dehydrogenase. Die NAD^+ -abhängige Form kommt nur in den Mitochondrien vor. Sie leitet den Wasserstoff an die Atmungskette weiter und dürfte daher für den Endabbau von Bedeutung sein. Die NADP^+ -abhängige Isocitrat-Dehydrogenase tritt im Mitochondrium und im Cytoplasma auf.

Das Ausmaß der Reaktion, die die NADP^+ -abhängige Form katalysiert, wird möglicherweise durch die Glutamat-Dehydrogenase mit bestimmt.

Der oxidative Abbau von Glutamat wird als potentieller Elektronendonator für die NADP^+ -Reduktion betrachtet. NADPH kann dann seinerseits die Reduktion von Ketoglutarat zum Isocitrat begünstigen (18):



Die Glutamat-Dehydrogenase, die durch oxidative Desaminierung aus Glutamat Ketoglutarat bildet, verbindet Ketoglutarat mit dem Aminosäurenstoffwechsel. Sie kommt ausschließlich in den Mitochondrien vor. Die Reaktion ist reversibel. Sie läuft mit NAD^+ und NADP^+ ab. Der Ammoniak, der hierbei entsteht und in höheren Konzentrationen toxisch ist, wird über den

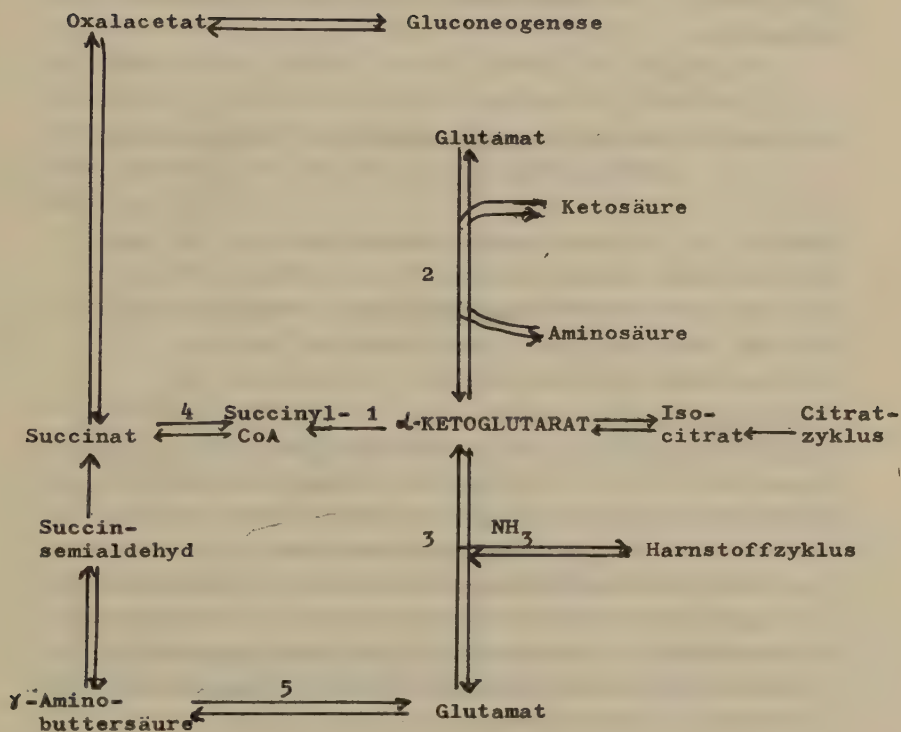
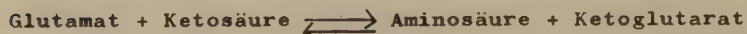


Abb. 1: Stellung des Ketoglutarates im intermediären Stoffwechsel

1. α-Ketoglutarat-Dehydrogenase
2. Transaminasen
3. Glutamat-Dehydrogenase
4. P-Enzym(Phosphorylierendes Enzym)= Succinat-Thiokinase
5. Glutamat-Decarboxylase

Harnstoffzyklus entgiftet.

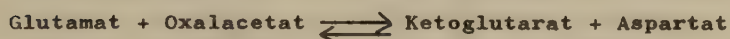
Eine weitere Verbindung zwischen Glutamat und Ketoglutarat wird durch eine Reihe von Transaminasen hergestellt. Die Reaktionen laufen nach folgendem Schema ab:



Ähnlich der Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion ist auch hier Glutamat und Ketoglutarat das Substrat bzw. Produkt. Der wesentliche Unterschied besteht darin, daß die Transaminierung ohne Oxidation abläuft. Transaminasen spielen eine Rolle beim Abbau von Aminosäuren. Über die Reaktion der Transaminasen können Aminosäuren in Glutamat übergeführt werden, das seinerseits durch Oxidation zum Ketoglutarat weiter abgebaut werden kann. Auf diese Weise werden Aminosäuren in den Citratzyklus eingeschleust. Der Abbau von Aminosäuren zum Ketoglutarat über die Transaminasen und Glutamat-Dehydrogenase ist vor allem in der Leber, in der Niere und im Gehirn begünstigt, da diese Organe eine ausreichend hohe Enzymaktivität aufweisen. Im Muskel dürfte der Abbau wegen der geringen Aktivität der Glutamat-Dehydrogenase keine große Rolle spielen. Da außerdem eine Reihe von Transaminasen nur im Cytoplasma, die Glutamat-Dehydrogenase hingegen nur in den Mitochondrien vorkommt, ist in diesen Fällen ein zusätzlicher Transport von Glutamat in das Mitochondrium erforderlich. Das Ketoglutarat muß in diesen Fällen wieder in das Cytoplasma transportiert werden, damit die Transaminierung dort stattfinden kann. Die Verknüpfung des Aminosäurestoffwechsels mit dem

Ketoglutarat ist vor allem bei der Gluconeogenese wichtig. Wird Ketoglutarat im Citratzyklus weiter abgebaut, so entsteht als Endprodukt Oxalacetat, das eine Schlüsselsubstanz für die Zuckerneubildung darstellt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die durch die Glutamat-Oxalacetat Transaminase (GOT) katalysierte Reaktion von Interesse. Der Aminrest wird hier von Glutamat oder Aspartat auf Oxalacetat bzw. Ketoglutarat übertragen.



Verläuft die Reaktion von rechts nach links, so entsteht auch hier Oxalacetat, das der Gluconeogenese zugeführt werden kann.

Der Umsetzung der GOT kommt beim Transport des glucoplastischen Kohlenwasserstoffgerüsts durch die Mitochondrienmembran eine wichtige Funktion zu. Oxalacetat, das als Substanz des Citratzyklus in den Mitochondrien gebildet wird, muß, wenn es der Gluconeogenese dienen soll, in das Cytoplasma transportiert werden.

Da die Mitochondrienmembran für Oxalacetat nicht permeabel ist, muß es in ein transportables Substrat umgewandelt werden. Bei entsprechend hohem Redoxpotential kann Oxalacetat zum Malat reduziert und als solches durch die Mitochondrienmembran wandern. Die zweite Transportmöglichkeit vollzieht sich über den sog. Malat-Aspartatshuttle (Abb. 2). Dieser Transport ist an keinen reduktiven Schritt gebunden. Oxalacetat wird in den Mitochondrien durch die GOT zum Aspartat transaminiert, für das die Mitochondrien-

membran permeabel ist. Da die Mitochondrienmembran auch für Ketoglutarat durchlässig ist, kann aus dem transportierten Aspartat und Ketoglutarat im Cytoplasma die umgekehrte Reaktion ablaufen: Es bildet sich unter dem Einfluß der GOT Glutamat und Oxalacetat, das dann für die Gluconeogenese im Cytoplasma zur Verfügung steht.

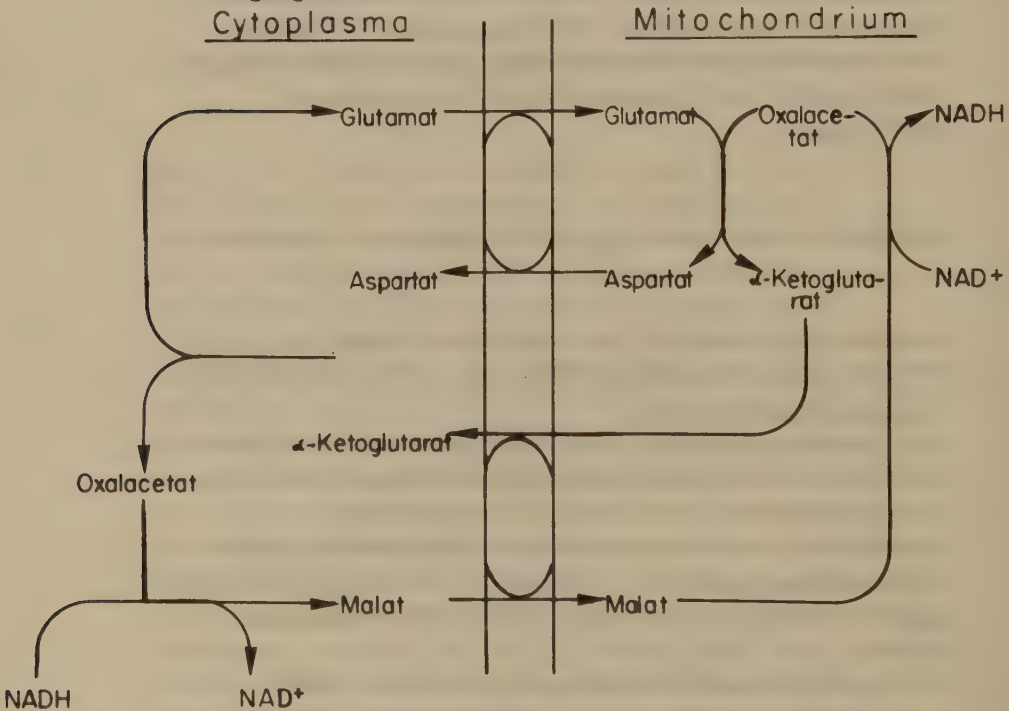


Abb. 2: Malat-Aspartatshuttle

In letzter Zeit wurden Überlegungen dahingehend angestellt, daß für die Reaktion der GOT die Ketoglutarat-Konzentration den geschwindigkeitsbestimmenden Faktor in vivo darstellen könnte. Da die GOT sowohl im Cytoplasma als auch in den

Mitochondrien vorkommt, könnte durch den Transport von Ketoglutarat bestimmt werden, in welchem Kompartiment die Reaktion überwiegend abläuft. Von dieser Regulierung wäre auch die KDH betroffen. Da dieses Enzym nur in den Mitochondrien auftritt, würde ein Transport von Ketoglutarat in das Cytoplasma den Ketoglutarat-Abbau über den Citratzyklus einschränken. Die Vorstellung, daß durch den Transport von Ketoglutarat dessen Abbau reguliert wird, basiert auf den Untersuchungen von DE HAAN und TAGER (20). Der Austritt von Ketoglutarat aus den Mitochondrien konnte durch Malonat beschleunigt werden. ROBINSON et al. (68) konnten andererseits zeigen, daß Malat Succinat und Malonat den Ketoglutarat-Gehalt in den Mitochondrien erhöhen.

1.2. Der katalytische Abbau von Ketoglutarat durch die KDH

Die KDH katalysiert den Abbau von Ketoglutarat zum Succinat. An dieser Reaktion beteiligen sich ähnlich wie bei der Pyruvat-Dehydrogenase drei katalytische Systeme, die von REED et al. (66) bei *Escherichia coli* abgetrennt werden konnten. Es sind dies die α -Ketoglutarat-Decarboxylase, die Thiamin-Pyrophosphat als prosthetische Gruppe enthält, die Lipoylreductase-Transsuccinylase mit α -Liponsäure als prosthetische Gruppe und schließlich die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (Diaphorase).

Neben *Escherichia coli* wurde der Multienzymkomplex auch aus dem Schweineherzen weitgehend isoliert (36, 37, 71). Hier weist der Enzymkomplex ein Molekulargewicht von $2,7 \cdot 10^6$ auf. Er enthält 6 Mol Thiamin-Pyrophosphat, 6 Mol α -Liponsäure und 9 Mol FAD.

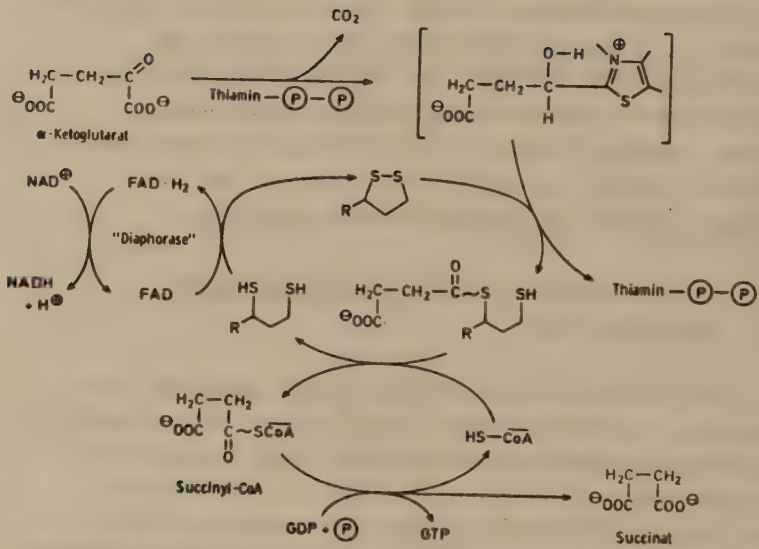


Abb. 3: Der katalytische Abbau von Ketoglutarat durch die KDH (35)

Die Reaktion stellt eine oxidative Decarboxylierung dar, die sich in mehrere Schritte aufteilen läßt.

Der erste Schritt, den die Ketoglutarat-Decarboxylase einleitet, besteht in der Anlagerung von Ketoglutarat an Thiamin-Pyrophosphat zum Succinsemialdehyd-Komplex unter Abspaltung von CO_2 . Dieser Semialdehyd-Komplex reagiert anschließend mit der oxidierten Form der α -Liponsäure unter Ausbildung der Dihydroliponsäure. Der Aldehyd wird dabei zur Carboxylgruppe oxidiert. In der darauffolgenden Teilreaktion wird der Succinylrest von der α -Liponsäure auf das CoA übertragen. An der Übertragung des Succinylrestes auf die α -Liponsäure und auf das CoA ist die Transferase beteiligt.

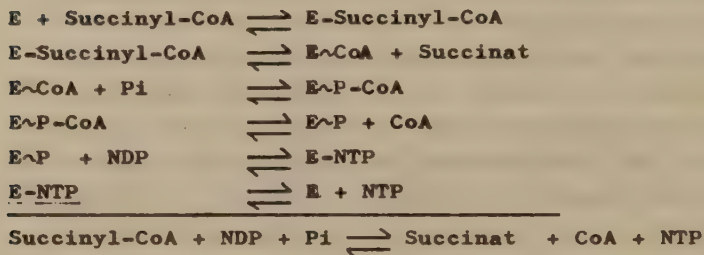
Schließlich entsteht dann unter dem Einfluß der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase durch Oxidation der Dihydroform wieder die α -Liponsäure. Die Wasserstoffatome werden dabei von FAD^+ aufgenommen und anschließend an NAD^+ weitergeleitet.

Die Reaktionsschritte, die beim Abbau von Ketoglutarat zum Succinyl-CoA ablaufen, sind analog denen des Pyruvat-Abbaus mit Hilfe der Pyruvat-Dehydrogenase.

Auch diese oxidative Decarboxylierung benötigt Thiamin-Pyrophosphat, α -Liponsäure, Diaphorase, CoA, NAD^+ und Mg^{2+} -Ionen.

Der weitere Abbau von Succinyl-CoA erfolgt über die Succinat-Thiokinase. Im folgenden wird dieses Enzym als P-Enzym (phosphorylierendes Enzym) bezeichnet. Dieser Schritt stellt die einzige Substratphosphorylierung im Citratzyklus dar. Damit wird die Bindungsenergie der Acyl-Mercaptanbindung direkt im ATP konserviert. Beim Abbau von Pyruvat hingegen wird die Energie der Acetyl-CoA Bindung für den Aufbau

von Citrat, Acetacetat oder Acetylphosphat verwertet.
Der Abbau von Succinyl-CoA zum Succinat vollzieht
sich nach CHA CHA und PARKS (15) in folgenden
Schritten:



E=Succinyl-CoA Synthase

E~P=Phosphorylierendes Enzym

NDP=Nucleosiddiphosphat

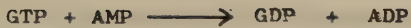
NTP=Nucleosidtriphosphat

Am gereinigten Enzym kann IDP GDP ersetzen(72,73)
jedoch nimmt in vollständigen Lebermitochonrien
nur GDP an der Reaktion teil.

Das aus der Reaktion hervorgehende GTP kann sich
mit ADP nach folgender Gleichung weiter umsetzen.
(72.73):



Möglicherweise spielt aber auch die Phosphorylierung
von AMP durch GTP eine Rolle(22,27):



Die Spaltung des Acyl-CoA-Esters über das P-Enzym ist nicht die einzig mögliche Abbaureaktion. Die Spaltung von Succinyl-CoA mit Hilfe der Succinyl-Decarboxylase stellt einen hydrolytischen Vorgang dar, bei dem die Bindungsenergie in Form von Wärme freigesetzt wird.

Eine wichtige Funktion kommt der Spaltung von Succinyl-CoA über die Succinyl-Acetacetyltransferase zu. Bei dieser Reaktion, die eine Verschiebung der CoA-Bindung vom Succinat auf Acetacetyl darstellt, wird Acetacetyl aktiviert. Auf dieser Weise wird Acetacetyl in ein metabolisierbares Produkt übergeführt. In der Leber spielt diese Reaktion keine Rolle (97). Dadurch wird die Verstoffwechselung der Ketonkörper an ihrem Entstehungsort verhindert.

1.3. Regulierung der KDH-Aktivität

Die Analogie zwischen Pyruvat- und Ketoglutaratabbau erstreckt sich nicht nur auf den Reaktionsmechanismus, sondern läßt sich z.T. auch auf die Regulierung der Aktivität ausdehnen.

WEITZMAN konnte bei Mikroben (*Acinetobacter*) eine Hemmung der KDH bis zu 50 % durch steigende NADH-Menge erzielen. Diese Hemmung war reversibel. ADP und AMP aktivierten das inaktive Enzym (92). Auch ATP hatte eine hemmende Wirkung auf die KDH. Diese Ergebnisse sind insofern von Interesse, als auch bei der Pyruvat-Dehydrogenase eine Inaktivierung durch ATP und NADH erfolgen kann und ADP eine Steigerung des Multienzymkomplexes bewirkt (12, 50, 64). Die Inaktivierung durch NADH gelang dem Autor auch

bei einem Coli-Stamm. Im Gegensatz zu dem aeroben Acinetobacter steigerten bei dem facultativ aeroben Bakterium AMP und ADP die Aktivität nicht. Ein analoges Ergebnis erbrachte auch die Beeinflussung der Citratsynthase. Bei beiden Mikrobenarten inaktivierte NADH das Enzym. ADP und AMP hingegen hatten nur bei dem aeroben Acinetobacter eine Steigerung der Citratsynthase zur Folge (92). Diese Ergebnisse zeigen eine sinnvolle Koordinierung der KDH-Regulierung mit dem Krebszyklus. Der in seinen Grundzügen geklärte Mechanismus der Pyruvat-Dehydrogenase Interkonvertierung führte zu einem intensiven Studium der KDH-Regulierung beim Säugetier.

REED et al.(66) konnten im Gegensatz zur Pyruvat-Dehydrogenase keine Phosphorylierung bei der KDH nachweisen. Der Einbau eines Phosphatrestes führt bei der Pyruvat-Dehydrogenase zu dessen Inaktivierung. Auch SMITH und WILLIAMSON konnten im gereinigten Enzym weder durch ATP noch durch GTP eine Veränderung der Aktivität beobachten(79).

Im Gegensatz zu diesen Befunden gelang OLSON et al. (59, 60, 61) der Nachweis der KDH-Inaktivierung durch GTP. In isolierten Lebermitochondrien wurde die Oxidation von NAD^+ -abhängigen Substraten erniedrigt, wenn die Mitochondrien mit Oligomycin und Ketoglutarat versetzt wurden. Dieser Effekt konnte durch gezielte Veränderung der GTP-Konzentration gesteuert werden. Da eine spezifische Hemmung der KDH durch Arsenit, Parapyruvat und 5-methoxyindol-2-carbonsäure die gleiche Wirkung wie GTP hatte, war die Schlußfolgerung naheliegend, daß auch GTP die KDH inaktiviert. Aufgrund der Tatsache, daß es bei der Inaktivierung der KDH zu einer Abnahme von NADH und einer Zunahme von FADH kommt, wurde außerdem gefolgert, daß GTP

die Übertragung des Wasserstoffs von FADH auf NAD^+ durch die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase hemmt (60). Die Untersuchungen an der gereinigten Dihydrolipoyl-Dehydrogenase konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen.

Möglicherweise nimmt bei der KDH GTP die Funktion ein, die ATP bei der Interconvertierung der Pyruvat-Dehydrogenase ausübt. Eine Beeinflussung der KDH durch GTP wäre physiologisch sinnvoll. GTP würde auf diese Weise seine Entstehung über die KDH regulieren.

Eine weitere Feedback-Hemmung wird von Garland (23) diskutiert. Nach seinen Untersuchungen an der Leber erniedrigt Succinyl-CoA den Umsatz von Ketoglutarat. Dieser Effekt konnte jedoch nur bei gleichzeitiger Erhöhung von NADH erreicht werden. Diese Beobachtung läßt sich mit der Feedback-Hemmung bei der Pyruvat-Dehydrogenase vergleichen. Hier hemmt Acetyl-CoA den oxidativen Abbau von Pyruvat.

GARLAND betrachtet die reduzierte und succinylierte α -Liponsäure, die bei Zusatz von NADH und Succinat entstehen soll, als die Ursache der Aktivitätsabnahme. Die Inaktivierung konnte durch CoA wieder rückgängig gemacht werden.

Es ist jedoch nicht gesichert, ob der Aktivierung durch CoA in vivo eine Bedeutung zukommt. MASSEY(53) untersuchte die Michaelis Konstante K_M an der gereinigten KDH. Er fand für die maximale Sättigung einen Wert, der unter $0,1 \mu\text{M}$ liegt. Da die intramitochondriale CoA-Konzentration bei $300 \mu\text{M}$ bis 2 mM (45) liegt, erscheint eine Regulierung über CoA zunächst unwahrscheinlich.

Die Regulierung der KDH über das Succinyl-CoA wurde in

letzter Zeit im Arbeitskreis von WILLIAMSON et al. (99,89,45) intensiv bearbeitet. Bei den Untersuchungen von LA NOUE et al. (45) zeigte sich eine Korrelation zwischen Succinyl-CoA und KDH-Aktivität. Die hemmende Wirkung von Succinyl-CoA trat auch bei niedriger NADH-Konzentration auf. Es scheint aber dem NADH/NAD Verhältnis ebenfalls eine Bedeutung in der Aktivitätsbeeinflussung zuzukommen.

Die Hemmung durch Succinyl-CoA verläuft kompetitiv mit CoA. Bei einer Zunahme des Verhältnisses Succinyl-CoA : CoA ist eine Inaktivierung der KDH zu erwarten.

Nach Meinung der Verfasser ist die Hemmung der KDH über das NADH/NAD -und Succinyl-CoA/CoA- Verhältnis direkt mit der Steuerung des Citratzyklus gekoppelt, da NADH und Succinyl-CoA die Citratsynthese beeinflussen können. Bedenkt man, daß auch dem ATP ein Effekt in dieser Richtung zugeschrieben wird, dann liefert die KDH drei Substanzen, die regulierend auf den Citratzyklus eingreifen können. Dies unterstreicht die Bedeutung der KDH im Rahmen des Citratzyklus.

Über die hormonelle Beeinflussung der KDH liegen nur einige Literaturberichte vor. UI et al. (89) schlossen aus Metabolitveränderung in der perfundierten Rattenleber, daß Glucagon bei Anwesenheit von exogenem Glutamat einen erhöhten Abbau von Ketoglutarat zum Oxalacetat im Citratzyklus bewirkt. Gleichzeitig wird aber Oxalacetat durch die ebenfalls gesteigerte GOT Reaktion weiter umgesetzt. Nach Meinung der Autoren liegt in diesen beiden Reaktionen ein entscheidender Angriffspunkt von Glucagon bei der Zuckerneubildung aus Glutamat.

SKOSEY(77) untersuchte die Auswirkung von ACTH auf die Decarboxylierung von Ketoglutarat.

In seinen Untersuchungen stimulierte ACTH die oxidative Decarboxylierung im epididymalen Fettgewebe der Ratte. Die Einwirkung von ACTH erfolgte über 3'-5'-cyclo AMP, das gleichzeitig anstieg. Die gesteigerte Oxidation von Ketoglutarat war nicht mit den Synthesevorgängen, die ACTH im Fettgewebe auslöste, korreliert.

Im Gegensatz hierzu beobachteten MACKERER et al. (51) keinen Effekt von Dibutyryl-3'-5'-cyclo AMP bei Lebermitochondrien der Ratte. Auch Insulin und Glucagon veränderten den Ketoglutarat-Abbau nicht. Streptozotocin und Alloxan Diabetes führten dagegen sowohl zu einer gesteigerten Oxidation als auch zu einer gesteigerten reduktiven Carboxylierung von Ketoglutarat. Beide Reaktionen ließen sich durch L-Oktanoylcarnitin hemmen.

1.4. Bedeutung des Citratzyklus

Da die KDH eine Reaktion im Citratzyklus katalysiert, sollte eine sinnvolle Regulierung dieser Reaktion auf die Funktion des Citratzyklus abgestimmt sein.

Die primäre Aufgabe des Citratzyklus ist es, die Zelle mit Energie zu versorgen. Dies erfolgt durch Abbau von Essigsäure unter Mitwirkung von Wasser zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff. - Der Abbau beginnt mit einer Vergrößerung des Moleküls, indem sich Acetyl-CoA und Oxalacetat zum Citrat kondensieren. Dieses Produkt wird dann durch successive Oxidation zum Oxalacetat abgebaut. Die der Oxidation parallel verlaufende Reduktion vollzieht sich mit Ausnahme des oxidativen Schrittes von Succinat am NAD^+ , das durch Aufnahme von Wasserstoff zum NADH übergeht.

Die energiereiche Verbindung entsteht mit Ausnahme der Succiny-CoA-Spaltung(vgl. S.10) erst in der Atmungskette. Hier werden die durch Oxidation freigegebenen Elektronen dem Sauerstoff unter Ausbildung von H_2O und der energiereichen Verbindung ATP zugeführt. Der Vorgang wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet.

Die Atmungskette kann prinzipiell mit allen NAD-abhängigen Dehydrierungen gekoppelt werden. Da der Citratzyklus und die Atmungskette im gleichen Kompartiment, nämlich in den Mitochondrien ablaufen, sind beide Prozesse besonders eng miteinander verbunden. Außerdem produziert der Citratzyklus eine besonders hohe Ausbeute an NADH.

Darüber hinaus kommt dem Citratzyklus eine große Bedeutung als Bindeglied zwischen den verschiedenen Ab- und Aufbauprozessen zu. Da Acetyl-CoA, das Ausgangsprodukt des Krebszyklus, bei der Glykolyse und beim Fettsäureabbau gebildet wird, entsteht auf diese Weise eine direkte Verbindung mit dem Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. Auf der Stufe des Ketoglutarats mündet der Aminosäurestoffwechsel in den Citratzyklus ein. Über Succinyl-CoA wird eine Brücke zum Häminsystem aufgebaut, und Oxalacetat eröffnet schließlich eine Verbindung zur Gluconeogenese.

1.5. Regulierung des Citratzyklus

Der Citratzyklus kann nur dann ablaufen, wenn die Elektronen, die durch die " Dehydrasen " freigesetzt werden, auf geeignete Elektronenakzeptoren wie z.B. NAD^+ oder FAD^+ übertragen werden können. NAD^+ und FAD^+ entstehen in den Mitochondrien durch Oxidation aus den reduzierten Formen über die Atmungs-

kette . Auf diese Weise wird eine Beziehung zwischen Sauerstoffversorgung und Citratzyklus hergestellt (16,17). Da bei dieser Reaktion ATP gebildet wird, überrascht es nicht, daß ATP auch regulierend in den Citratzyklus eingreift. Eine ausreichende ATP Versorgung sollte den Durchgang durch den Citratzyklus bremsen, ein Abfall von ATP aber stimulierend wirken.

Das Einwirken von ATP auf den Citratzyklus soll über die Inaktivierung von Enzymen erfolgen. ATP hemmt in physiologischen Konzentrationen die Citrat-Synthese und verringert auf diese Weise das Ausgangssubstrat des Krebszyklus (27,76). Dieser Befund wurde am gereinigten Enzym gewonnen. Da die intramitochondriale ATP-Konzentration nicht mit der Citrat-Synthase Aktivität korreliert, wurde ATP als Regulator der Citratsynthese angezweifelt (58,75).

Das Ausmaß der Citrat-Synthese kann neben ATP auch von der Oxalacetatkonzentration bestimmt werden. Die Theorie, Oxalacetat als limitierende Größe für den Citrataufbau zu betrachten, wurde in Verbindung mit der Produktion von Ketonkörpern viel diskutiert. Da ketotische Zustände vor allem bei geringem Kohlenhydratangebot und verstärktem Fettstoffwechsel auftreten, wurde eine Erniedrigung des Oxalacetats auf eine reduzierte Glykolyse zurückgeführt. Abnahme der Glykolyse verringert das Pyruvat, das das Ausgangsprodukt für die Oxalacetat-Synthese darstellt(42, 43,49).

KREBS diskutiert in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, daß im Status erhöhter Gluconeogenese Oxalacetat für diese Syntheseleistung der Mitochondrien entzogen wird und ein Aufbau von Citrat nicht

mehr in vollem Umfange möglich ist.

WIELAND(96) widerlegte die Annahme einer Oxalacetat-Abnahme auf Grund der Einschränkung der Glykolyse. Da Oxalacetat mit Malat im Gleichgewicht steht, wäre eine gleichzeitige Abnahme von Malat zu erwarten gewesen. Dies konnte unter ketotischen Zuständen nicht beobachtet werden. WIELAND(96) registrierte eine Zunahme von Malat. Eine Abnahme von Oxalacetat könnte demnach auf ein erhöhtes Redoxpotential zurückzuführen sein.

In zahlreichen Untersuchungen konnte eine Zunahme von reduzierten Pyridinnucleotiden beobachtet werden (10, 94, 29, 39, 93).

Von WIELAND wurde schließlich ein hemmender Effekt langkettiger Fettsäuren-CoA-Ester auf die Citratsynthase diskutiert(95). Auch hier wurde die biologische Bedeutung angezweifelt.

Der Autor konnte zwar eine Inaktivierung der Citratsynthase mit Palmityl-CoA erreichen, jedoch scheint die Hemmung in den Mitochondrien nicht mit der Konzentration der langkettigen Fettsäureester parallel zu gehen(24). Außerdem ist die Inaktivierung bereits nach sehr kurzer Zeit nicht mehr reversibel (78, 88, 95).

Trotz aller Bedenken gilt als gesichert, daß ein gesteigerter Fettabbau zu einer Einschränkung des Citratzyklus führt. Im Organismus spielen derartige Prozesse in pathologischen Zuständen, z.B. Diabetes Mellitus, oder bei extremen Belastungen, z.B. Hunger, eine Rolle. Im Falle der Zuckerkrankheit ist der Organismus aufgrund der fehlenden Glucoseverwertung darauf angewiesen, seinen Energiebedarf aus der Lipolyse zu decken. Das hierbei in höherem Ausmaß anfallende Acetyl-CoA kann aber nicht weiter im

Citratzyklus verbrannt werden. Die Acetyl-CoA-konzentration wird dann durch den Aufbau von Acetacetat und β -Hydroxybutyrat beseitigt. Ähnliche Verhältnisse liegen nach längerem Nahrungsentzug vor. Auch hier werden in erster Linie die Fettreserven abgebaut. Dies äußert sich ebenfalls in der Zunahme der Ketonkörper.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere und ihre Haltung

Als Versuchstiere dienten weiße Leghornhühner der HNL-Linie (Gut Heinrichsruh bei München).

Untersucht wurden Tiere verschiedener Entwicklungsstufen, angefangen mit Embryonen, die sich kurz vor dem Schlupf befanden, bis zu geschlechtsreifen Hühnern. Die Eier für die Untersuchungen an Embryonen wurden im institutseigenen Brüter ausgebrütet. Gefüttert wurden handelsübliches Kükenalleinfutter, Junghennenalleinfutter und Legemehl (Fa. Dr. Zentz & Co. Feldmochinger Kraftfutter).

2.2. Präparation der Homogenate

Die Aktivitätsbestimmung der Enzyme wurde im Herzen, in der Leber, in der Niere und im Gehirn durchgeführt. Versuchstiere und Kontrolltiere wurden stets am gleichen Tag untersucht. Dies war erforderlich, weil Hühner sehr von Umwelteinflüssen abhängig sind. In der perinatalen Phase - 3 Tage vor dem Schlupf bis 3 Tage nach dem Schlupf - wurden für die Aktivitätsbestimmungen im Herzen je 4 Tiere, in der Leber je 3 und im Gehirn ebenfalls 3 Tiere gemeinsam für die Homogenataufbereitung verwendet. Um einen eventuellen Einfluß des Narkotikums auf die Enzymaktivität auszuschließen, wurden die Tiere mechanisch betäubt, anschließend möglichst schnell Leber, Herz und Niere herauspräpariert und die Organe in einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Zange(nach Wollenberger und Bücher) gepreßt. Bei den Untersuchungen des Gehirnes wurden die Tiere ohne vorherige Narkose dekapitiert und der Kopf sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Beim Einfrieren des Kopfes kam es zu einem Aufbrechen der Schädeldecke, so daß das tiefgefrorene Gehirn leicht herausgenommen werden konnte.

Die Organe wurden sodann in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser zerkleinert und in dieser Form bis zur Homogenataufbereitung im flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die weitere Zerkleinerung wurde mit Hilfe eines Ultraturrax (TP 18/2, Janke & Kunkel, Staufen i.B.) durchgeführt. Die pulverisierten Proben wurden in der doppelten Menge eines gekühlten Phosphatpuffers (20mM pH 7,0), der 50% Glycerin enthielt, aufgenommen. Das Gemisch wurde nach dem Auftauen 15 Sekunden homogenisiert und anschließend sofort wieder eingefroren. Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt. Das auf diese Weise hergestellte " rohe Homogenat " bildete die Grundlage für die Enzymbestimmung, die noch am selben Tage durchgeführt wurde.

2.3. Bestimmung der KDH

Für die Bestimmung der KDH-Aktivität sind in der Literatur photometrische und manometrische Methoden beschrieben.

Bei der photometrischen Bestimmung dient die Veränderung von NADH als Maß für die Enzymaktivität (25,36,37). Da die Aktivitätsmessung im Homogenat durchgeführt werden sollte, schied diese photometrische Methode aus.

Es bot sich aber das manometrische Verfahren, dem das entstehende CO_2 als Meßgröße zugrunde liegt (28, 33,71), an.

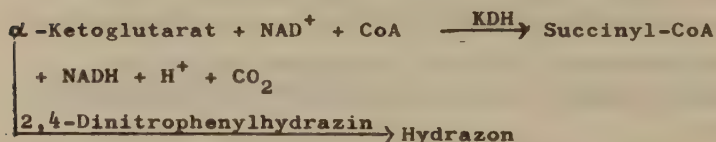
Bei dieser Methode war zwar eine Zunahme der CO_2 -Bildung im Testansatz registriert worden, die Anwendung stieß aber auf Schwierigkeiten, weil der Anstieg nicht linear verlief. Versuche, die Enzym-

messung durch Zusätze zum Testansatz zu stabilisieren, waren ohne Erfolg.

Es wurden folgende Zusätze untersucht: Rinderserum-albumin, Imidazolpuffer, KCN, ADP.

Eine strenge Linearität zur eingesetzten Homogenat-menge konnte bei einer von Wittmann (101) entwickelten Methode erreicht werden.

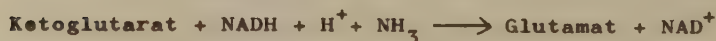
Bei dieser Methode, die analog der Glutamat-Dehydrogenase Bestimmung nach KING(38) durchgeführt wird, wird die Menge des abgebauten Ketoglutarats bestimmt. Der Bestimmung liegt folgende Reaktion zugrunde:



Das Gleichgewicht der Reaktion

Seite von Succinyl-CoA (31).

Die durch die Glutamat-Dehydrogenase katalysierte Reaktion



läuft nur bei erhöhter NH_4^+ -Ionen Konzentration ab (30). Die endogene NH_4^+ -Ionen-Konzentration beeinflusst die KDH-Reaktion nicht.

Für die Bestimmung der KDH-Aktivität wurde das rohe Homogenat der Organe noch zusätzlich mit 100 mM Phosphatpuffer(pH 7,0)verdünnt, und zwar Herz 1:5, Leber 1:3 und Niere ebenfalls 1:3.

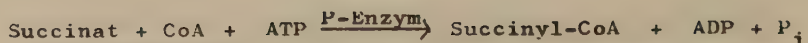
Der Versuchsansatz enthielt folgende Zusammensetzung: 0,5 ml α -KGS (0,96 mM in 0,1 M PO_4^- - Puffer, pH 7,0); 0,1 ml MgCl_2 -Lösung (0,004 M); 0,1 ml CoA (0,001 M); 0,01 ml Mercaptoäthanol (0,01 M); 0,2 ml NAD^+ (0,002M); 0,1 ml bzw. 0,05 ml Homogenat und 0,05 ml H_2O .

Das Reaktionsgemisch wurde 5 Minuten bei 30°C vorinkubiert. Um eine Inaktivierung der KDH in dieser Zeit zu verhindern, wurde das verdünnte Homogenat erst im Anschluß an die Vorinkubation zum Testansatz gegeben. Gestartet wurde mit CoA (0,001 M, 0,1 ml). In den Blindproben wurde CoA durch Aqua dest. ersetzt. Es wurden jeweils 3 Blindproben und 4 Hauptproben angesetzt. Die Reaktion, die bei 30°C ablief, wurde nach 8 Minuten durch Zugabe von 1 ml Ketonreagens (20 mg 2-4-Dinitrophenylhydrazin in 100 ml in 1N HCL gelöst) gestoppt und das nicht umgesetzte Ketoglutarat bei 37°C in das Hydrazon übergeführt.

Die Reaktion war nach 20 Minuten beendet. Anschließend wurde der Farbkomplex durch Zugabe von 5 ml NaOH (0,4 n) gebildet. Die Messung erfolgte bei 405 nm gegen ein Gemisch aus Wasser und Ketonreagens. Die der Extinktionsdifferenz zugrunde liegende Ketoglutaratmenge wurde mit Hilfe einer Eichkurve bestimmt. Unter den gegebenen Bedingungen entspricht 0,1 mMol α -Ketoglutarat einer Extinktionsdifferenz $\Delta E = 0,12$. Die Aktivität wird in mMol abgebautes Ketoglutarat pro Minute wiedergegeben. 1 Einheit $\hat{=}$ 1 mMol abgebautes Ketoglutarat/Minute.

2.4. Bestimmung des P-Enzyms

Da das P-Enzym eng mit dem Ketoglutaratabbau verbunden ist, wurde es in die Untersuchungen mit einbezogen. Das P-Enzym wurde nach der Methode von KAUFMAN (36, 37) bestimmt. Ihr liegt folgende Reaktion zugrunde:



Das bei der Reaktion entstehende Succinyl-CoA ist instabil und wird durch Zugabe von NH_4OH in die stabilere Hydroxamsäure übergeführt.

Die Hydroxamsäure gibt mit FeCl_3 einen Farbkomplex, der bei 546 nm quantitativ bestimmt werden kann.

Die Reaktion wurde von Wittmann (101) beim Huhn überprüft.

Sie verläuft unter optimalen Bedingungen im pH-Bereich von 7,0 bis zu 20 Minuten linear und proportional der eingesetzte Homogenatmenge.

Organüberstände zeigten in Vergleich zu den Homogenaten einen um etwa 30% erhöhten Extintionswert. Daher wurden bei allen untersuchten Organen die Organüberstände verwendet, die durch Zentrifugation (10000 xg, 2 Minuten) mit einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Modell 3200) gewonnen wurden.

Vergleichende Untersuchungen mit einer Kühlzentrifuge zeigten, daß die kurzzeitige Behandlung der Homogenate bei Zimmertemperatur keinen Einfluß auf die Aktivität ausübt.

Da beim Übergang von der prae- in die postnatale Phase Veränderungen im Stoffwechsel zu erwarten waren, die wegen der gesteigerten Sauerstoffaufnahme nach dem Schlupf sich vor allem in den Mitochondrien bemerkbar machen sollten, wurden Substrat- und Adenosinnucleotid-Bestimmungen in die Untersuchungen mit einbezogen. Als Substrate wurden die Redoxpaare β -Hydroxybutyrat/Acetacetat sowie Lactat/Pyruvat gewählt, die nach BUCHER et al. und KLINGENBERG et al.

(14, 40) ein Kriterium für das Redoxpotential in den Mitochondrien bzw. im Cytoplasma darstellen. Von den Adenosinnucleotiden wurde das Tri-, Di- und Monophosphat bestimmt. Für die Substrat- und Adenosinnucleotid-Bestimmung wurde ein gemeinsamer Organextrakt hergestellt(6).

Die nach der Gefrierstopp-Methode gewonnene Leber wurde unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser pulverisiert. Nach Verdünnung(1:5) mit 6%-iger Perchlorsäure wurde das Gemisch noch einmal im Mörser zerrieben. Das hierbei entstehende viskose Gemisch wurde dann im Ultraturrax 30 Sekunden homogenisiert und anschließend durch Zentrifugation(10 Minuten 10000 xg) ein Überstand gewonnen. Der Niederschlag wurde in verdünnter 6%-iger Perchlorsäure suspendiert und abermals 10 Sekunden bei 10000 xg zentrifugiert.

Beide Überstände wurden vereinigt und dienten als Ausgangslösung für die Substrat- und Nucleotidbestimmung. Für die Bestimmung von Pyruvat, Lactat, ATP, ADP und AMP wurde ein Teil des Überstandes auf pH 3,5 eingestellt. Der verbliebene Überstand wurde auf pH 7,0 eingestellt und für die Acetacetat und Hydroxybutyrat-Bestimmung verwendet.

Außerdem wurde auch noch Blutzucker nach der GOD-Methode bestimmt(7).

2.5. Reagentien

Glucagon wurde von Eli Lilly & Company, Indianapolis, Rinderserumalbumin und Glutamat, Adrenalin, Insulin und ACTH von Serva, Heidelberg, bezogen.

Die Enzyme, Coenzyme und Substrate mit Ausnahme von Thiamin-Pyrophosphat sowie die Combi-Tests für die Bestimmung des Blutzuckers liefert die Firma Boehringer,

Mannheim, die übrigen Reagentien sowie Thiamin-Pyrophosphat die Firma E. Merck AG, Darmstadt.

Nembutal wurde von ABBOTT S.A. 28.-Saint-Rémy-sur-Avre France, bezogen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Vorversuche

Um die KDH reproduzierbar bestimmen zu können, mußten zunächst einige Parameter der Aktivitätsbestimmung standardisiert werden.

Taballe 1 zeigt den Einfluß der Pufferlösung beim Homogenisieren und Verdünnen auf die KDH-Aktivität. Die Versuche wurden mit der Niere durchgeführt. Die höchste Aktivität wurde erreicht, wenn das Organ mit Glycerin-Phosphatpuffer homogenisiert und mit Phosphatpuffer(100 mM pH 7,0) verdünnt wurde. Veränderung des PH-Wertes und Aufschluß mit Saccharose ergaben eine geringere Aktivitätsausbeute.

Tabelle 1

Einfluß des Puffers auf die KDH-Aktivität

Eingesetzter Puffer:			
a. beim Homogenisieren	b. beim Verdünnen des rohen Homogenats(1:5)	ΔE_{405nm} einem Homogenateinsatz von	
		0,05ml	0,10ml
Glycerinphosphatpuffer	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0	0,042	0,087
Glycerinphosphatpuffer	0,1 M Phosphatpuffer pH 6,4	0,025	0,045
Saccharose 0,25 M	0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0	0,030	0,066

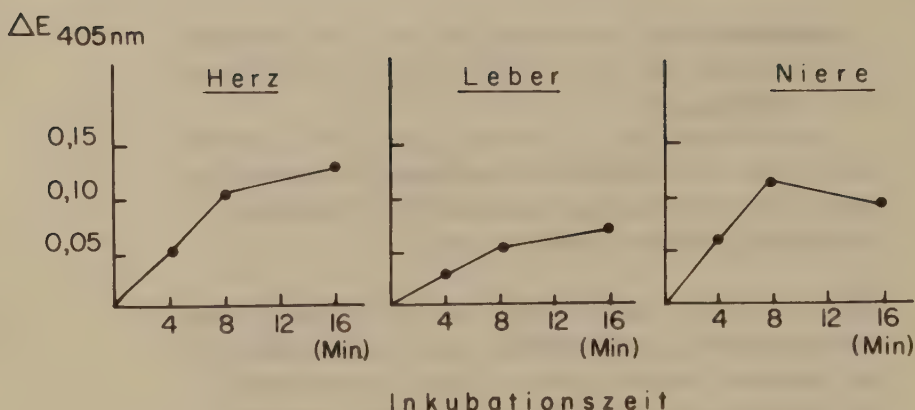


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der KDH-Aktivität

In der Abbildung 4 ist der zeitliche Verlauf der Aktivität wiedergegeben. Nach dieser Abbildung verläuft der Ketoglutaratabbau nur kurze Zeit linear.

Ähnliche Ergebnisse liegen auch bei der photometrischen Methode der KDH-Bestimmung an teilweise gereinigten Enzympräparaten vor (71).

Versuche, den linearen Verlauf über die angegebene Zeit hinaus durch Veränderung des Testansatzes zu steigern, waren nicht erfolgreich.

Eine Veränderung der Aktivität konnte durch Zusatz von Cystein und Glutathion erreicht werden.

Die in Tabelle 2 aufgeführte Molarität gibt die Konzentration von Cystein bzw. Glutathion im Reaktionsgemisch wieder.

Wie Tabelle 2 zu entnehmen ist, ist die Wirkung von Cystein und Glutathion nicht einheitlich. Einen deutlichen KDH-Anstieg bei beiden Organen verursachte Cystein in einer Konzentration von 0,1 M.

Tab. 2: Einfluß von Cystein und Glutathion auf die
KDH Aktivität(E, 405nm bei 0,10ml Einsatz)

Organ	Kontrolle	Cystein		Glutathion	
		0,1 M,	0,01 M	0,1M,	0,01 M
Herz	0,04	0,11	0,11	0,11	0,11
	0,05	0,15	0,16	0,15	0,15
	0,06	0,12	0,12	0,11	0,11
Leber	0,09	0,13	0,07	0,09	0,05
	0,05	0,08	0,03	0,06	0,05
	0,08	0,12	0,06	0,07	0,06

Wurde eine Konzentration von 0,01 M eingesetzt, dann verringerte sich die Aktivität der Leber geringgradig. Im Herzen ist die Wirkung ähnlich der 0,1 M Cystein Konzentration. Wurde Glutathion eingesetzt, so wurde auch hier im Herzen bei beiden Konzentrationen ein deutlicher Aktivitätsanstieg erreicht. In der Leber hingegen bewirkte Glutathion keine deutlichen Aktivitätsveränderungen.

Der Anstieg ist wahrscheinlich auf eine Einwirkung der Sulfhydrylgruppen auf die α -Liponsäure zurückzuführen. Vergleichbare Befunde wurden auch bei der Pyruvat-Dehydrogenase, die ebenfalls die α -Liponsäure als Coenzym enthält, beschrieben(9).

Die Ursachen der Organspezifischen Unterschiede wurden nicht näher untersucht. Eine Verlängerung der Linearität konnte, wie Abbildung 5 zeigt, jedoch auch durch Glutathion nicht erzielt werden.

Thiamin-Pyrophosphat hatte eine hemmende Wirkung auf die KDH. Mit steigender Konzentration des Coenzym verringerte sich die Aktivität des Enzym (Abb. 6).

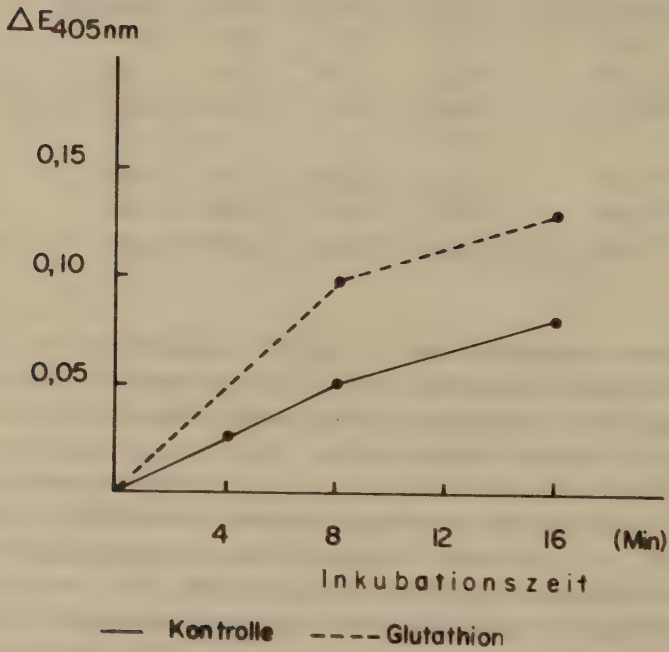


Abb. 5: Einfluß von Glutathion auf den zeitlichen Verlauf der KDH-Aktivität (Herz)

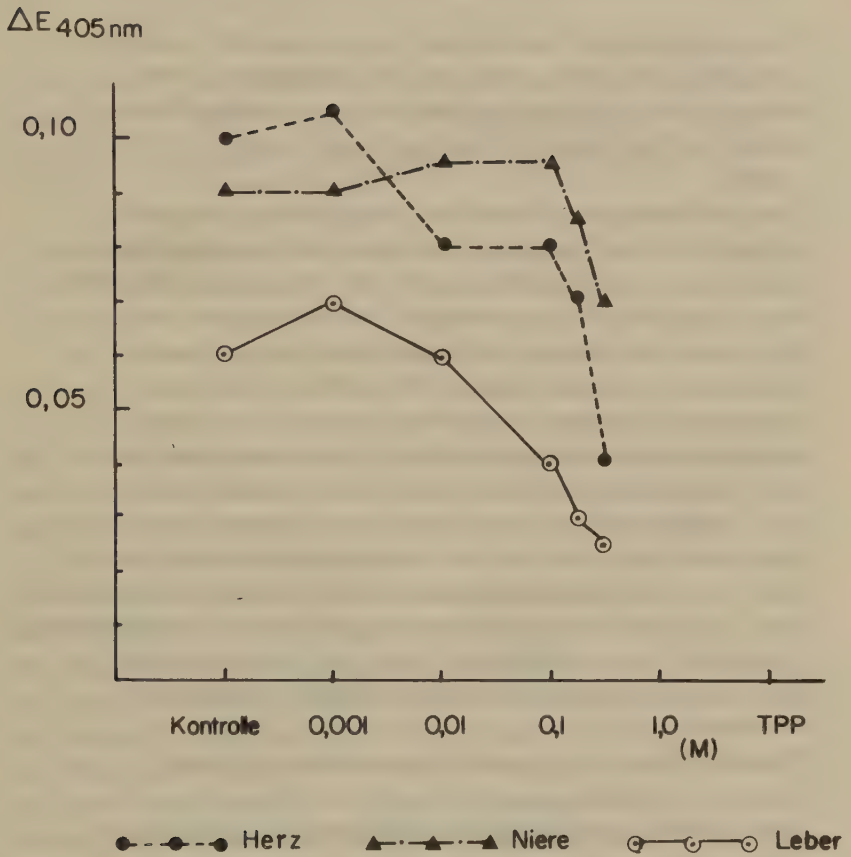


Abb. 6: Einfluß von Thiamin-Pyrophosphat auf die KDH-Aktivität

In der Niere setzte der Aktivitätsverlust erst bei einer Konzentration von 0,1 M ein.

Im einem letzten Vorversuch sollte geklärt werden, inwieweit die Zeit, die für die Präparation der Organe nach Eröffnen der Bauch- und Brusthöhle benötigt wird, einen Einfluß auf die Enzymaktivität ausübt.

Die Eröffnung der Bauch- und Brusthöhle beim Ge- glügel ist im Gegensatz zum Säugetier aus anatomischer Gegebenheit problematisch. Da der Vogel kein Zwerch- fell besitzt und Verletzungen der Luftsäcke beim Eröffnung der Bauch- und Brusthöhle nicht immer verhindert werden können, ist infolge gestörter Sauerstoffaufnahme eine Beeinflussung des Stoff- wechsels nicht ausgeschlossen. Untersuchungen bei der Taube (83) und beim Huhn (100) zeigten, daß der ATP-Spiegel in der Leber schon in sehr kurzer Zeit nach dem Eröffnen der Bauchhöhle abnimmt, auch wenn die Blutversorgung des Organes nicht unterbunden ist. Da der Citratzyklus eng an die Sauerstoffversorgung gekoppelt ist, könnte die Zeit, die bei der Prä- paration verstreicht, einen Einfluß auf die KDH ausüben.

Hierüber sollte folgende Versuchsdurchführung Auskunft geben:

Den Tieren wurde nach der Betäubung die Bauch- und Brusthöhle geöffnet und die Leber entweder sofort entnommen -dies beanspruchte ca. 10 Sekunden- oder erst 60-90 Sekunden nach dem Eröffnen der Bauch- und Brusthöhle.

Wie Tabelle 3 zu entnehmen ist, ist bis 90 Sekunden nach Eröffnen der Bauch- und Brusthöhle kein Einfluß auf die KDH-Aktivität festzustellen.

Tab. 3: Einfluß des Zeitpunktes der Organentnahme
auf die KDH der Leber (ΔE_{405nm})

Alter der Tiere in Wochen	Zeitpunkt(in Sekunden) der Organentnahme nach Eröffnen der Bauch- und Brusthöhle			
	10	60	80	90
3	0,09	0,10		
3	0,10	0,11		
3	0,09	0,09		
4	0,11		0,11	
11	0,11			0,08
11	0,06			0,09

Aus diesem Ergebnis allein darf jedoch nicht der Schluß gezogen werden, daß die ATP-Konzentration, die sich in dieser Zeit verringert (83,100), keinen Einfluß auf die KDH-Aktivität ausübt.

Da die KDH ein mitochondriales Enzym darstellt, dürfte im Falle einer Aktivitätsregulierung die Adenosinnucleotid-Konzentration in diesem Kompartiment ausschlaggebend sein. Eine Abnahme der ATP-Konzentration durch die Eröffnung der Bauch- und Brusthöhle sollte sich aber in erster Linie auf den cytoplasmatischen Anteil erstrecken(44), der den ca. 5-fachen Betrag des Mitochonriums ausmacht.

3.2. Hauptversuche

3.2.1. Veränderungen der KDH und des P-Enzyms während der Ontogenese.

Im ersten Teil wurden die Veränderungen der KDH im Verlaufe der Entwicklung untersucht. Für die KDH-Bestimmung in der pränatalen Phase mußte das Aufschlußverfahren in der Leber modifiziert werden. Dieses Organ weist pränatal einen sehr hohen Fettgehalt auf. Die hierdurch entstehende Trübung des Homogenates verhindert eine genaue Extinktionsmessung. Versuche, die Trübung durch organische Lösungsmittel zu beseitigen, waren nicht erfolgreich. Auch Zusätze zur Natronlauge, die im Anschluß an die Hydratzonabildung zur Farbentwicklung dem Reaktionsgemisch zugesetzt wird (vgl. S. 23), brachten keine Besserung. Ein störungsfreies Homogenat konnte aber durch Zentrifugation bei tiefen Temperaturen gewonnen werden. Dabei wurde folgendermaßen Verfahren: Die Leber wurde, wie im Abschnitt 2.2. beschrieben, mit Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurde das rohe Homogenat bei -12°C (10 Minuten 4000 xg) zentrifugiert. Die lipoiden Substanzen bildeten dabei eine dünne Schicht über dem Homogenat, die mit dem Spatel leicht entfernt werden konnte. Das Homogenat konnte in dieser gereinigten Form verwendet werden. Auf die gleiche Weise wurde die Leber auch nach dem Schlupf (bis zum 3. Tag) behandelt, da auch hier noch eine starke Verfettung der Leber zu beobachten war. Auf eine Untersuchung der Niere in der pränatalen Phase wurde verzichtet. Aufgrund ihres geringen Gewichtes gestaltete sich deren Präparation zu diesem Zeitpunkt sehr schwierig.

Wie Abbildung 7 zu entnehmen ist, weisen die pränatale Leber und das pränatale Herz eine sehr geringe KDH-Aktivität auf, die aber unmittelbar nach dem Schlupf sprunghaft zunimmt. Bei 4 Wochen alten Küken ist die KDH-Aktivität im Herzen deutlich höher als unmittelbar nach dem Schlupf. In der Leber liegen die Verhältnisse genau umgekehrt. Zwischen 6. und 8. Woche ist in der Leber abermals ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Legehühner weisen in der Leber und im Herzen annähernd die gleiche Aktivität auf wie 4. bis 6. Wochen alte Küken.

Auch im Gehirn ist die KDH-Aktivität um die Geburt herum nur schwach entwickelt. Der in der perinatalen Phase registrierte Aktivitätsanstieg ist nicht signifikant (Abb. 8). In der Niere war von der 4. bis zum 8. Woche ein kontinuierlicher Anstieg zu beobachten (Abb. 8)

Vergleicht man den Verlauf der KDH mit dem des P-Enzyms, so verhalten sich in der perinatalen Phase Leber und Gehirn anders als das Herz. Nur im Herzen ist der Anstieg der KDH auch von einem Anstieg des P-Enzyms begleitet (Abb. 9). In den beiden anderen Organen tritt in dieser Zeit keine Veränderung des P-Enzyms auf (Abb. 8, Abb. 9).

Die Veränderungen der beiden Enzyme spiegeln sich in den Werten der Tabelle 4 wider, die das Verhältnis von KDH zu P-Enzym darstellen. Im Herzen und im Gehirn verändert sich die Relation von der KDH zum P-Enzym kaum. Dies ist darauf zurückzuführen, daß im ersten Falle eine annähernd gleich große Zunahme beider Enzyme um die Zeit des Schlupfes erfolgt und im zweiten Falle beim Übergang von der prä- in die postnatale Phase weder die KDH noch das P-Enzym aktiviert werden.

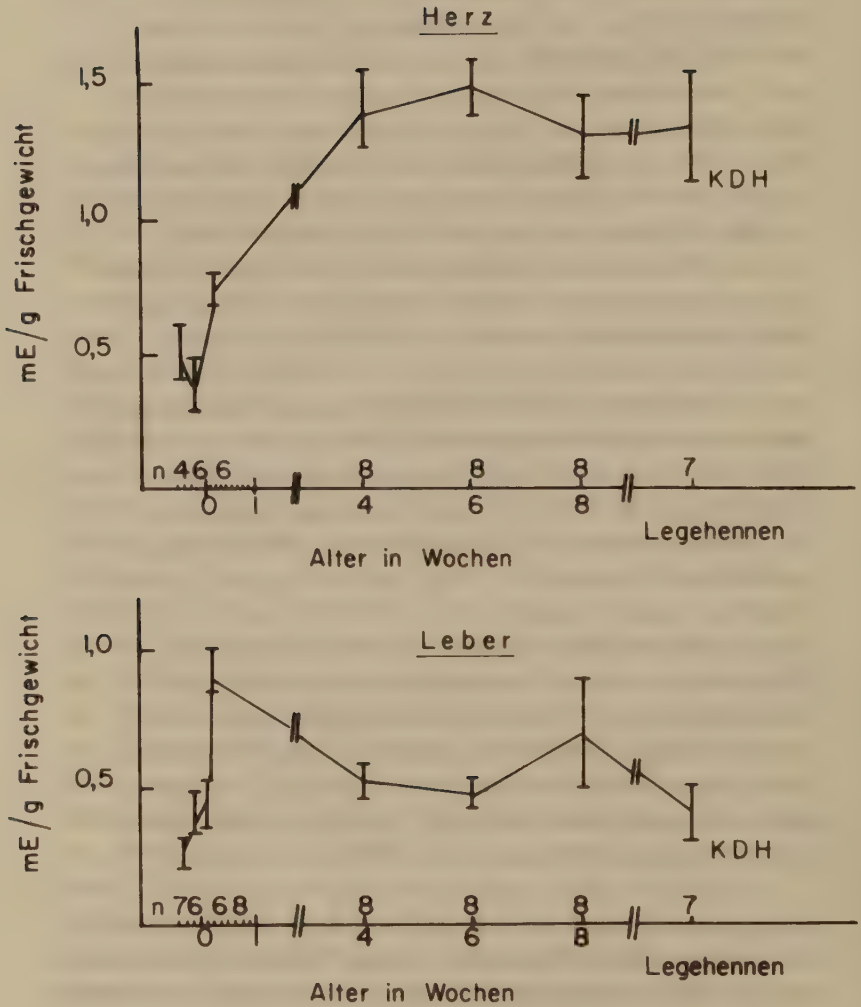


Abb. 7: Aktivität der KDH im Herzen und in der Leber während der Ontogenese
(n=Anzahl der Versuche)

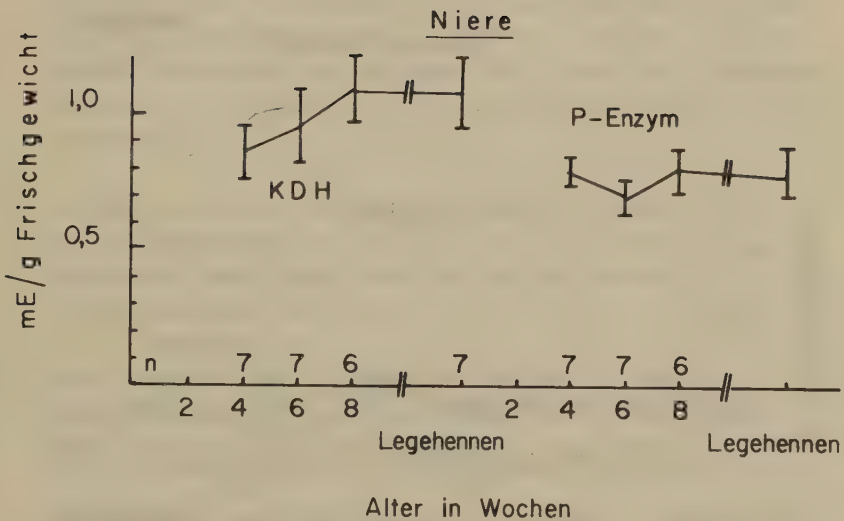
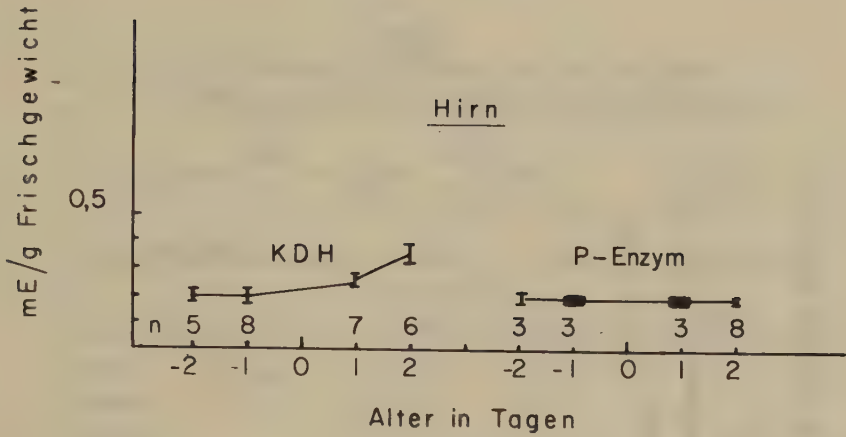


Abb. 8: Aktivität der KDH und des P-Enzyms
im Gehirn und in den Niere in der
perinatalen Phase bzw. Postnatalen Phase
 (Das negative Vorzeichen bezieht auf die
 Tage vor dem Schlupf, n=Anzahl der Versuche)

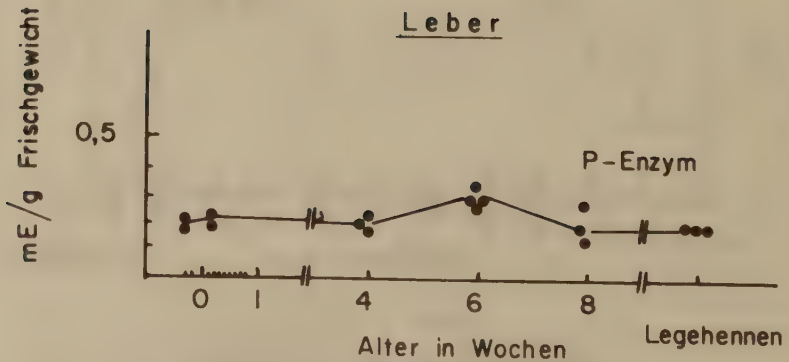
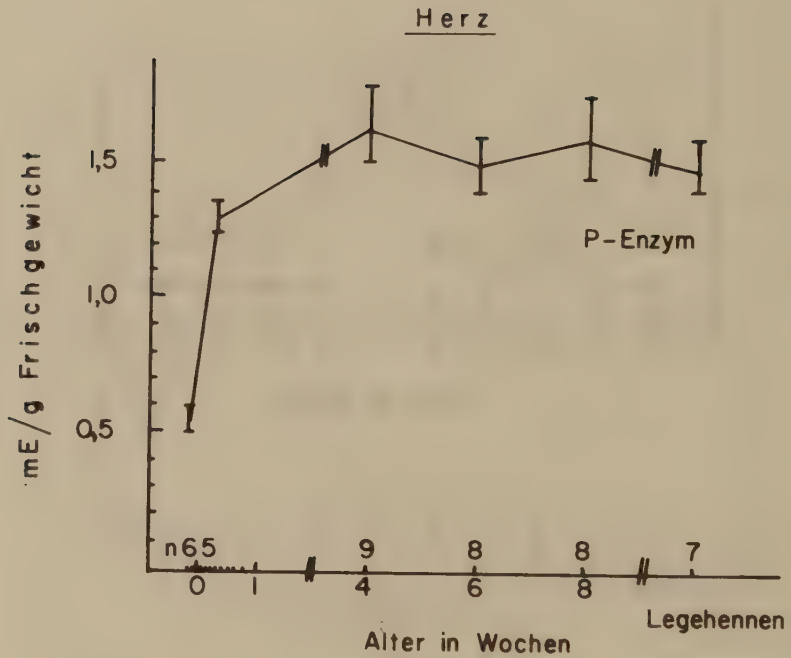


Abb. 9: Aktivität des P-Enzyms im Herzen und in der Leber während der Ontogenese
(n=Anzahl der Versuche)

Tab. 4: Verhältnis der Aktivitäten von KDH und P-Enzym beim Huhn und bei der Ratte (Leber)

Organ/Alter	Huhn		Ratte	
	pränatal	postnatal (2-3 Tage alt)	6 Wochen	15 Wochen
Herz	1,2	1,0	1,0	
Leber	2,4	3,5	2,5	3,5
Niere			1,4	
Hirn	1,0	1,2		

In der Leber erstreckt sich der Aktivitätsanstieg nur auf die KDH, so daß das Verhältnis zugunsten der KDH zunimmt. Gleichzeitig ist aus der Tabelle 4 zu ersehen, daß sich, mit Ausnahme der Leber, die Umsetzung, die die KDH katalysiert, in etwa der des P-Enzyms entspricht.

Vergleicht man die einzelnen Organe untereinander, so ist im Herzen die höchste, im Gehirn die geringste Aktivität enthalten. Auch die Leber erreicht nur einen sehr kleinen Wert.

Ein Vergleich mit der Rattenleber zeigt, daß bei dieser Spezies sowohl die KDH wie auch das P-Enzym eine größere Aktivität aufweisen (Abb. 10).

In die Untersuchungen über die perinatalen Veränderung wurden auch das cytoplasmatische und das mitochondriale Redoxpotential, die durch das Redoxpaar Lactat/Pyruvat bzw. β -Hydroxybutyrat/Acetacetat

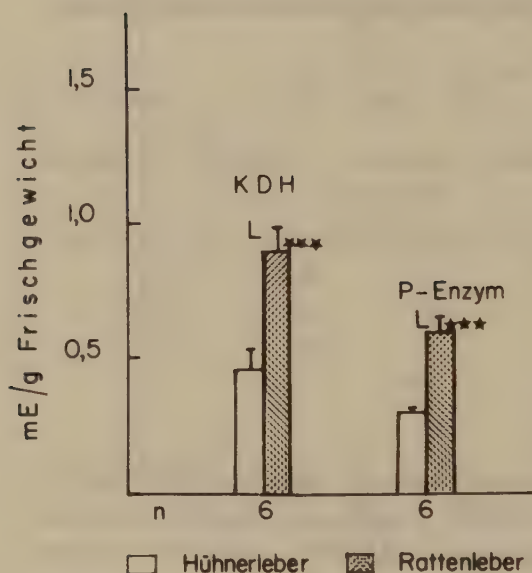


Abb. 10: Aktivität der KDH und des P-Enzyms in der Leber von Huhn und von der Ratte

n=Anzahl der Versuche ; L=Leber

*** $\alpha < 0,001$: statistische Signifikanz nach dem Student t-Test

bestimmt wurden, und die Adenosinnucleotidphosphate einbezogen.

Vor dem Schlupf ist in beiden Kompartimenten das Redoxpotential zugunsten der reduzierten Verbindungen verschoben. Bereits zwei Tage nach dem Schlupf vergrößert sich das Redoxpotential im Cytoplasma weiter zugunsten der reduzierten Form. Diese Tendenz wird 16. Tage nach dem Schlupf noch deutlicher. In den Mitochondrien sind die Verhältnisse umgekehrt. Am 2. Tage nach dem Schlupf ist eine Abnahme des reduzierten und eine Zunahme des oxidierten Substrates

Tab. 5: Veränderungen des Redoxpotentials und der Adenosinnucleotidphosphat-Konzentration in der Leber während der perinatalen Phase und nach Applikation von Glutamat

Alter	Pyruvat	Lactat	β -Hydroxy- butyrat	Acet- acetat	ATP	ADP	AMP	Verhältnis von Lactat/ Pyruvat	β -Hydroxy- butyrat/ Acetacetat	ATP/ ADP ATP/ AMP
1 bis 2 Tage v.d. Schlupf										
// Mol/g Frischgewicht										
a. Normal- Tiere	0,05 (6) $\pm$ 0	0,51 (6) $\pm$ 0,13	0,96 (5) $\pm$ 0,23	0,08 (5) $\pm$ 0,06	0,88 (6) $\pm$ 0,17	1,05 (6) $\pm$ 0,21	1,30 (6) $\pm$ 0,42	10,2	12,0	0,8 0,6
b. mit Glu- tammat be- handelt	0,05 (6) $\pm$ 0,02	1,02 (6) $\pm$ 0,36	0,74 (6) $\pm$ 0,12	0,07 (5) $\pm$ 0,03	0,75 (6) $\pm$ 0,36	1,16 (6) $\pm$ 0,20	1,22 (6) $\pm$ 0,36	20,4	10,6	0,4 0,6
2 Tage n.d. Schlupf	0,05 (6) $\pm$ 0,01	1,24 (6) $\pm$ 0,25	0,49 (6) $\pm$ 0,11	0,16 (6) $\pm$ 0,04	0,54 (6) $\pm$ 0,14	1,52 (6) $\pm$ 0,31	2,37 (5) $\pm$ 0,73	24,8	3,6	0,4 0,6
16 Tage n.d. Schlupf	0,08 (5) $\pm$ 0,01	4,12 (4) $\pm$ 1,40	0,25 (5) $\pm$ 0,09	0,14 (5) $\pm$ 0,06	0,58 (5) $\pm$ 0,24	1,48 (5) $\pm$ 0,44	2,18 (4) $\pm$ 0,59	51,6	1,7	0,4 0,3

*; $\alpha < 0,05$
 **; $\alpha < 0,01$
 ***; $\alpha < 0,001$

Statistische Signifikanz nach dem Student t-Test
 (bezogen auf die embryonalen Normaltiere)
 Die Klammern enthalten die Anzahl der Versuche. Die Werte sind mit den
 Standardabweichungen ($\pm$) angegeben.

zu beobachten. Im Alter von 16. Tagen hat sich die Konzentration der beiden Substrate etwa ausgeglichen. Der Ausgleich erfolgt durch Abnahme von β -Hydroxybutyrat und durch gleichzeitige Acetacetat-Zunahme. Bei den Adenosinnucleotidphosphaten erniedrigte sich nach der Geburt ATP, während ADP und AMP anstiegen (Tab. 5.).

3.2.2. Einfluß des Futterentzuges auf die KDH- und P-Enzymaktivität

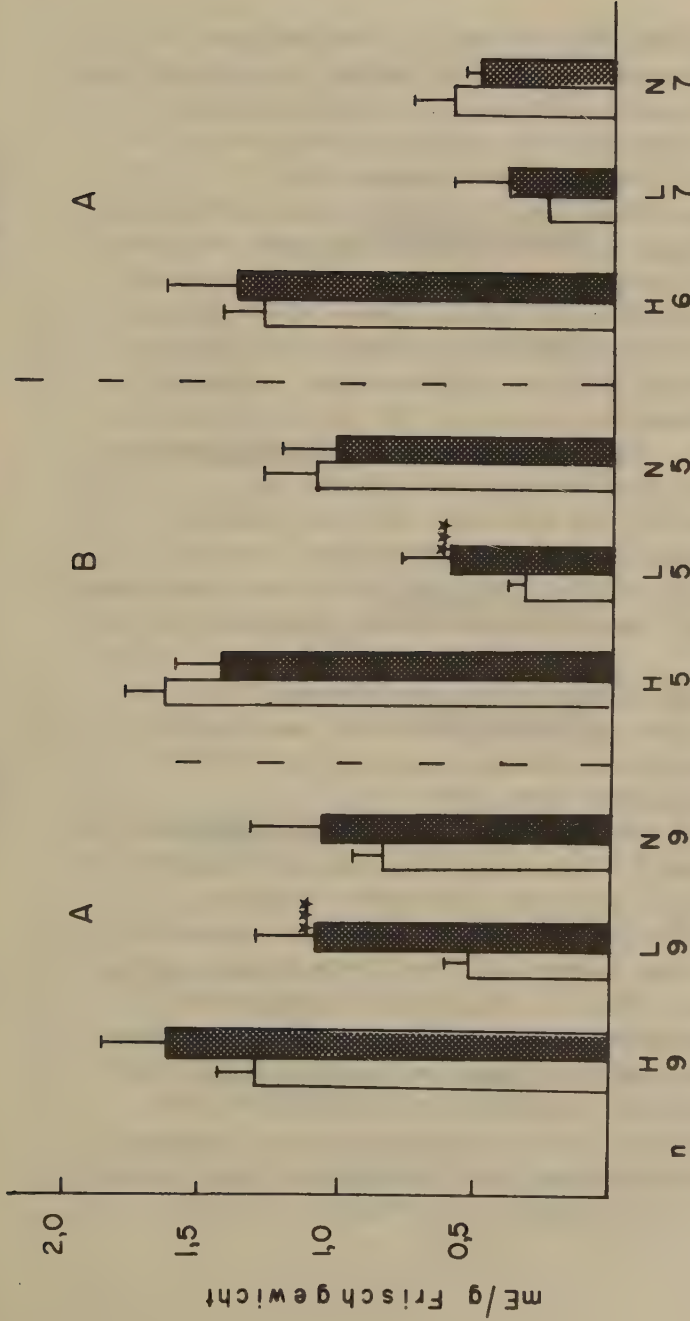
Den Tieren wurden 4 Tage das Futter entzogen und nach diesem Zeitraum die KDH und das P-Enzym im Herzen, in der Leber und in der Niere bestimmt. Die Untersuchungen zeigten hier einen signifikanten Anstieg der KDH in der Leber von männlichen Jungtieren und Legehennen. Im Herzen und in der Niere der männlichen Jungtiere war ebenfalls die Tendenz eines Anstieges festzustellen. Der Unterschied ließ sich aber statistisch nicht absichern. Herz und Niere der Legehennen zeigten hier eher eine entgegengesetzte Tendenz (Abb 11). Das P-Enzym veränderte seine Aktivität nicht signifikant.

3.2.3. Einfluß von Glutamat auf die KDH- und P-Enzymaktivität

Glutamat wird in vivo- und in vitro-Versuchen zur Folge in erster Linie zum Ketoglutarat umgesetzt(89). Am weiteren Abbau scheint auch die KDH eingeschaltet zu sein (69,85,89). Der direkte Nachweis über die KDH-Aktivität wurde bis jetzt nicht geführt. Mit den folgenden Versuchen sollte dieser Schritt des Ketoglutaratabbaus untersucht werden.

P-Enzym

KDH



□ Kontrolle ■ Hungertiere

Abb. 11: Einfluß von Hunger auf die KDH- und P-Enzym-Aktivität
*** ; 0,001 statistische Signifikanz nach dem Student t-Test

n=Anzahl der Versuche; H=Herz; L=Leber; N=Niere
A=männliche Jungtiere B=Legehehenen

Zunächst wurden Studien über die Verträglichkeit von Glutamat durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen von Glutamat intraperitoneal an Hühner verabreicht. Die applizierte Menge variierte zwischen 0,9g und 1,8g/kg Körpergewicht.

Dabei zeigte sich, daß die maximal eingesetzte Konzentration von 1,8g/kg Körpergewicht nicht von allen Tieren gleichmäßig vertragen wird. Das applizierte Glutamat bewirkte bei einigen Tieren eine Verlangsamung der Gewichtszunahme um durchschnittlich 25%. Zum Teil wurde auch eine geringgradige Steigerung der Wachstumsrate beobachtet. Sie betrug im Durchschnitt 9%. Schließlich führte die intraperitoneale Applikation auch zu gehäuften Todesfällen.

Ein Einfluß auf die KDH wurde nur dann beobachtet, wenn gleichzeitig eine Gewichtszunahme eintrat.

In diesen Fällen hatte Glutamat nur in der Leber eine signifikante Zunahme der Aktivität zur Folge (Abb. 12 Teil A).

Nachdem sich gezeigt hatte, daß Glutamat bei 4 bis 8 Wochen alten Hühnern einen Einfluß auf die KDH ausübt, wurde auch dessen pränataler Einfluß bei Embryonen studiert (Abb. 13).

Zu diesem Zweck wurden pro Tag unter sterilen Kautelen 0,3 ml einer 2 M Glutamat-Lösung in das bebrütete Ei appliziert. Die erste Applikation erfolgte 5 bzw. 4 Tage vor dem Schlupf und wurde am darauffolgenden Tage wiederholt. Die KDH-Bestimmung wurde dann 2 bzw. 1 Tag vor dem Schlupf durchgeführt.

In die Enzymuntersuchungen wurde das Gehirn miteinbezogen und zwar aus folgenden Gründen: Einmal verursacht Glutamat besonders bei juvenilen Tieren Gehirnschäden (1, 67). Darüberhinaus ist im Gehirn der Abbau von Glutamat über Ketoglutarat zum Succinat nicht der ausschließliche Stoffwechselweg. Eine

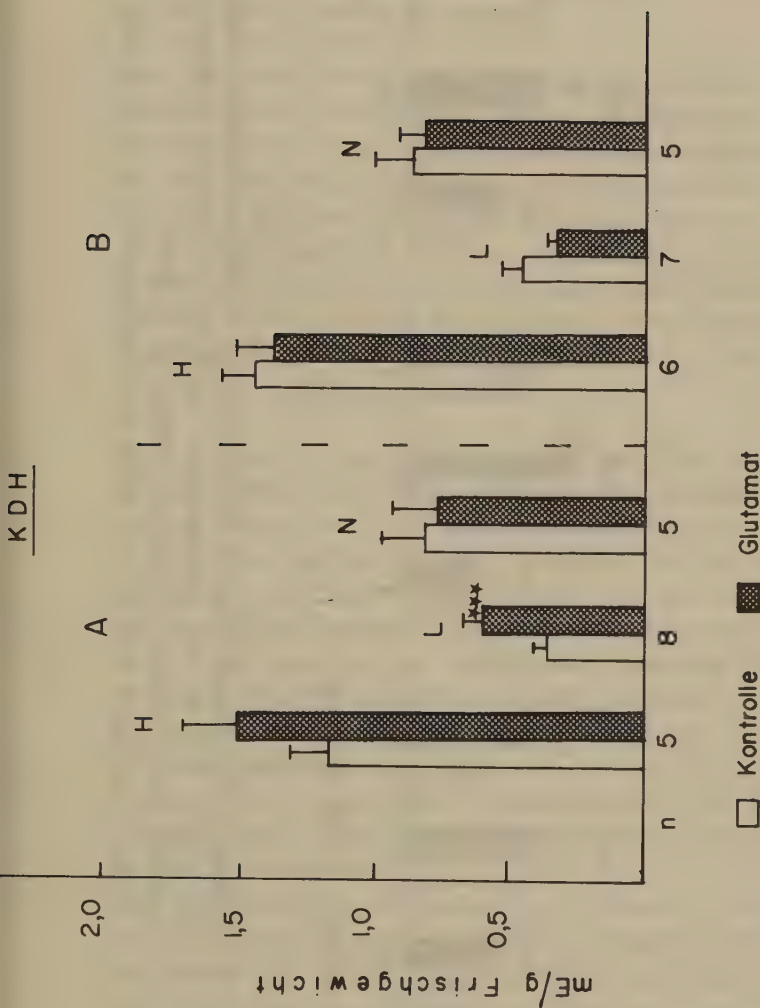


Abb. 12: Einfluß von Glutamat auf die KDH-Aktivität

***; $\alpha < 0,001$ statistische Signifikanz nach dem Student t-Test

n=Anzahl der Versuche; H=Herz; L=Leber; N=Niere

A: Tiere mit geringgradig erhöhte Wachstumsrate nach Glutamatverabreichung

B: Tiere mit erniedrigter Wachstumsrate nach Glutamatverabreichung

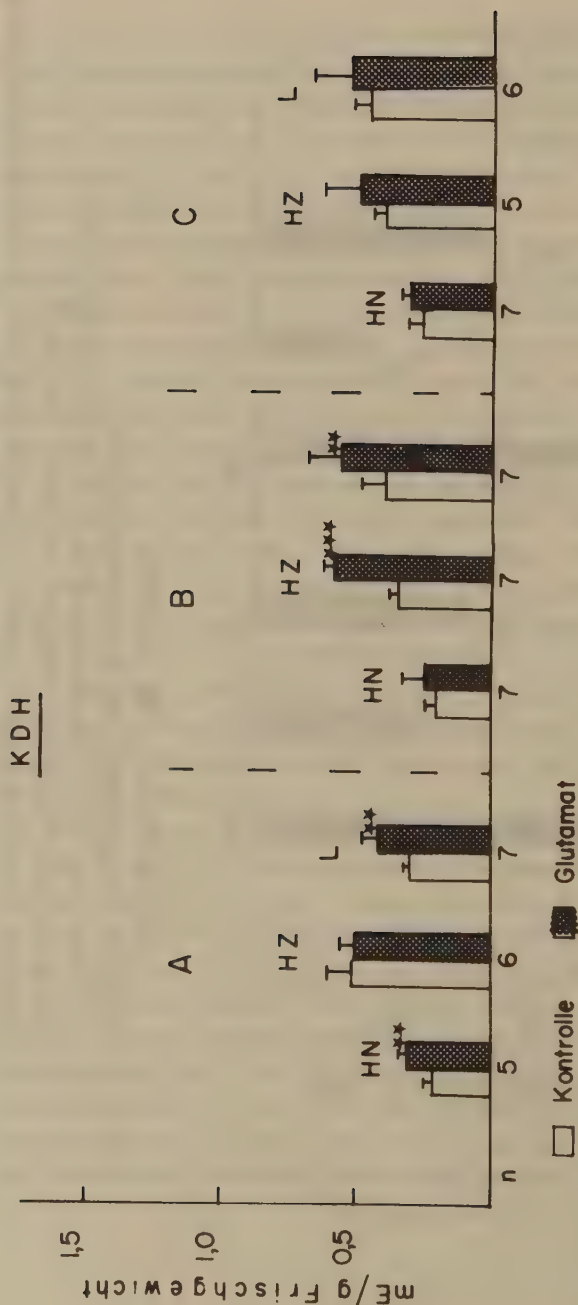


Abb. 13: Einfluß von Glutamat auf die KDH-Aktivität in der perinatalen Phase

$^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$ statistische Signifikanz nach dem Student t-Test

n=Anzahl der Versuche; HN=Hirn; HZ=Herz; L=Leber

A: 2 Tage vor dem Schlupf, B: 1 Tag vor dem Schlupf, C: 1 Tag nach dem Schlupf

zweite Möglichkeit bietet sich über die Glutamat-Decarboxylase zur γ -Aminobuttersäure und von hier weiter zum Succinat an (4,8).

Auch pränatal war ein Einfluß von Glutamat auf die Mortalität zu beobachten. Gegenüber nichtbehandelten Tieren erhöhte sich die pränatale Sterblichkeit um etwa 50%. Eine Steigerung der Glutamatmenge über die oben angegebenen Konzentrationen hinaus hatte höhere Todesfälle zur Folge. Auch der Zeitpunkt der Applikation scheint einen Einfluß auf die Mortalität auszuüben. Wurden 0,3 ml der 2 M Glutamat-Lösung bereits 14 Tage vor dem Schlupf injiziert, so lag die Mortalität weit über 50%.

Ähnlich den postnatalen Küken war auch bei den pränatalen Küken ein Einfluß von Glutamat auf die KDH zu beobachten, der jedoch nicht einheitlich ausfiel. Im Gehirn war zwei Tage vor dem Schlupf und im Herzen ein Tag vor dem Schlupf ein Aktivitätsanstieg zubeobachten. In der Leber war an beiden Tagen die KDH signifikant erhöht. Auch einen Tag nach dem Schlupf wiesen die mit Glutamat behandelten Tieren eine erhöhte Aktivität auf. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht mehr gesichert (Abb. 13). Gleichzeitig wurden das cytoplasmatische und das mitochondriale Redoxpotential sowie die Adenosin-nucleotide bestimmt.

Wie aus Tabelle 5 zu ersehen ist, erhöhte sich durch Glutamatapplikation der absolute Betrag von Lactat, und damit das Verhältnis Lactat/Pyruvat zugrunde des Pyruvates. Bei den übrigen Substanzen war keine Veränderung zu beobachten.

3.2.4. Hormonelle Beeinflussung der KDH- und der P-Enzymaktivität

Mit den folgenden Untersuchungen sollten durch Applikation von Hormonen besondere Stoffwechselsituationen geschaffen werden, deren Auswirkung auf die KDH-Aktivität verfolgt wurde. In diesem Zusammenhang interessierte vor allem der Einfluß auf den Fettstoffwechsel, um Vergleiche mit der Pyruvat-Dehydrogenase anstellen zu können. Die Versuche wurden an männlichen Jungtieren durchgeführt. Es wurden folgende Hormone appliziert: Glucagon, Insulin, ACTH und Adrenalin.

Dem Glucagon kommt neben seiner Wirkung auf den Kohlenhydratstoffwechsel beim Huhn ein besonders ausgeprägter lipolytischer Effekt zu (26,70,47,48). Die Applikation von Glucagon erhöht schon innerhalb sehr kurzer Zeit die Konzentration der unveresterten Fettsäuren im Blut. Abweichend vom Säugetier steigt beim Huhn durch Insulin die unveresterte Fettsäurekonzentration im Blut (47,48). Der lipolytische Effekt von ACTH und Adrenalin ist beim Huhn nicht in dem Ausmaß ausgeprägt wie beim Säugetier (77). Es sind aber Versuche beschrieben, denen zur Folge ACTH die Oxidation von Ketoglutarat im Fettgewebe der Ratte beschleunigen (77). Adrenalin verursacht beim Huhn eine Erhöhung der Spontanaktivität der Pyruvat-Dehydrogenase (32). Auch im Fettgewebe der Ratte wurde ein Einfluß von Adrenalin auf dieses Enzym beobachtet (34).

Insulin:

Das Hormon wurde an Tiere verabreicht, denen für 12 Stunden das Futter entzogen worden war. Es wurden 10 IE/kg Körpergewicht intramuskulär verabreicht

und 2 Stunden danach die Organe gewonnen.

Glucagon:

Glucagon wurde kurz- und langfristig appliziert. Im ersten Falle wurden zweimal je 0,5 mg/kg Körpergewicht im Abstand von einer Stunde intramuskulär injiziert. Die Tiere wurden dann 30 Minuten nach der zweiten Injektion getötet.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Glucagon über einen Zeitraum von 6 Tagen verabreicht.

Es wurden pro Tag 0,5 mg/kg Körpergewicht Glucagon gegeben. Die letzte Applikation erfolgte 60 Minuten vor der Tötung.

ACTH:

Diese Hormon wurde 6 Tage intramuskulär verabreicht. Die Dosis betrug 30 IE/kg Körpergewicht pro Tier.

Adrenalin:

Mit Adrenalin wurden kurz- und langzeitige Versuche durchgeführt.

Bei der kurzzeitigen Behandlung wurde eine einmalige Dosis von 1,5 mg/kg Körpergewicht intramuskulär injiziert und die Tiere 1 Stunde später getötet.

Eine zweite Gruppe wurde 8 Tage lang mit Adrenalin behandelt, wobei die tägliche Dosis 0,8 mg/kg Körpergewicht betrug. Bei allen Versuchen wurden die Kontrolltiere mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt.

Um sicher zu stellen, daß die applizierten Hormone zum Zeitpunkt der Tötung wirksam waren, wurde bei der Applikation von Glucagon, Insulin und Adrenalin zusätzlich der Blutzucker im Vollblut untersucht. Die Bestimmung der Glucose im Vollblut ist nach Angaben der Literatur (5) wegen der hohen Schwankungen

**Tab. 6: Aktivität der KDH und des P-Enzyms nach
Insulinapplikation**

		KDH(mE/g Frisch- gewicht)			P-Enzym(mE/g Frischgewicht)		
		n	X	SA	n	X	SA
Herz	Kontrolle	8	1,23	$\pm 0,35$	9	1,73	$\pm 0,61$
	Insulin	8	1,02	$\pm 0,35$	9	2,01	$\pm 0,43$
Leber	Kontrolle	8	0,66	$\pm 0,20$	6	0,20	± 0
	Insulin	8	0,61	$\pm 0,27$	6	0,20	$\pm 0,10$
Niere	Kontrolle	8	1,35	$\pm 0,62$	6	0,54	$\pm 0,44$
	Insulin	8	0,85	$\pm 0,24$	6	0,61	$\pm 0,22$
Blut- zucker	Kontrolle	8	180	$\pm 11,1$			
	Insulin	8	70	$\pm 24,9$	(mg Glucose/100ml Blut)		

**Tab. 7: Aktivität der KDH und des P-Enzyms nach
ACTH-Applikation**

		KDH(mE/g Frisch- gewicht)			P-Enzym(mE/g Frischgewicht)		
		n	X	SA	n	X	SA
Herz	Kontrolle	10	1,33	$\pm 0,29$	9	1,34	$\pm 0,40$
	ACTH	10	1,49	$\pm 0,43$	9	1,42	$\pm 0,40$
Leber	Kontrolle	10	0,53	$\pm 0,15$	5	0,33	± 0
	ACTH	10	0,60	$\pm 0,16$	5	0,30	$\pm 0,10$
Niere	Kontrolle	9	1,03	$\pm 0,20$	9	0,60	$\pm 0,20$
	ACTH	9	1,20	$\pm 0,20$	9	0,60	$\pm 0,20$
Blut- zucker	Kontrolle	7	251	$\pm 53,4$			
	ACTH	7	268	$\pm 27,8$	(mg Glucose/100ml Blut)		

n=Anzahl der Versuche; X=Durchschnittswerte;
SA= Standardabweichung

Tab. 8: Aktivität der KDH und des P-Enzyms nach langzeitiger Glucagonapplikation

		KDH(mE/g Frischgewicht)			P-Enzym(mE/g Frischgewicht)		
		n	X	SA	n	X	SA
Herz	Kontrolle	8	1,44 ± 0,20		8	1,20 ± 0,20	
	Glucagon	8	1,40 ± 0,30		8	1,20 ± 0,17	
Leber	Kontrolle	11	0,40 ± 0,13				
	Glucagon	11	0,51 ± 0,13				
Niere	Kontrolle	8	1,03 ± 0,19		9	0,73 ± 0,15	
	Glucagon	8	0,90 ± 0,20		9	0,70 ± 0,18	
Blut-	Kontrolle	6	224 ± 8		(mg Glucose/100ml Blut)		
zucker	Glucagon	6	547 ± 200				

Tab. 9: Aktivität der KDH und des P-Enzyms nach kurzzeitiger Glucagonapplikation

		KDH(mE/g Frischgewicht)			P-Enzym(mE/g Frischgewicht)		
		n	X	SA	n	X	SA
Herz	Kontrolle	11	1,44 ± 0,20		8	1,52 ± 0,30	
	Glucagon	11	1,51 ± 0,18		8	1,62 ± 0,43	
Leber	Kontrolle	8	0,57 ± 0,18				
	Glucagon	8	0,67 ± 0,19				
Niere	Kontrolle	8	1,24 ± 0,17		9	0,61 ± 0,30	
	Glucagon	8	1,10 ± 0,17		9	0,61 ± 0,33	
Blut-	Kontrolle	9	230 ± 16,5		(mg Glucose/100ml Blut)		
zucker	Glucagon	9	606 ± 86,6				

n=Anzahl der Versuche; X=Durchschnittswerte;

SA=Standardabweichung

Tab. 10: Aktivität der KDH und des P-Enzyms nach
langzeitiger Adrenalinapplikation

		KDH(mE/g Frisch- gewicht)			P-Enzym(mE/g Frischgewicht)		
		n	X	SA	n	X	SA
Herz	Kontrolle	8	1,50 ± 0,20		7	1,50 ± 0,10	
	Adrenalin	8	1,35 ± 0,19		7	1,32 ± 0,30	
Leber	Kontrolle	7	0,68 ± 0,10		5	0,22 ± 0	
	Adrenalin	7	0,63 ± 0,15		5	0,20 ± 0	
Niere	Kontrolle	6	1,10 ± 0,19		9	0,60 ± 0,32	
	Adrenalin	6	0,99 ± 0,12		9	0,53 ± 0,20	
Blut - Kontrolle		9	217 ± 27,0				
zucker Adrenalin		9	310 ± 79,0				
(mg Glucose/100ml Blut)							

Tab. 11: Aktivität der KDH und des P-Enzyms nach
kurzzeitiger Adrenalinapplikation

		KDH(mE/g Frisch- gewicht)			P-Enzym(mE/g Frischgewicht)		
		n	X	SA	n	X	SA
Herz	Kontrolle	8	1,46 $\pm$ 0,21		6	1,31 $\pm$ 0,30	
	Adrenalin	8	1,41 $\pm$ 0,25		6	1,40 $\pm$ 0,50	
Leber	Kontrolle	8	0,64 $\pm$ 0,14		8	0,85 $\pm$ 0	
	Adrenalin	8	0,79 $\pm$ 0,35		8	0,45 $\pm$ 0	
Niere	Kontrolle	8	1,06 $\pm$ 0,21		9	0,61 $\pm$ 0,30	
	Adrenalin	8	1,31 $\pm$ 0,35		9	0,55 $\pm$ 0,15	
Blut-	Kontrolle	8	230 $\pm$ 16,5				
zucker	Adrenalin	8	426 $\pm$ 90,2				
(mg Glucose/100ml Blut)							

n= Anzahl der Versuche; X= Durchschnittswerte;
SA= Standardabweichung

der Erythrozyten problematisch. Da aber die Glucosebestimmung der Überprüfung der Hormonwirkung diene, reichte für diesen Zweck die Glucosebestimmung im Vollblut aus.

Bei den Versuchen mit Insulin wurde das Blut aus der Flügelvene, bei den übrigen Versuchsreihen aus dem Herzen genommen. Der geringe Blutzuckerwert der Normaltiere aus der Versuchsreihe mit Insulin im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen dürfte auf die unterschiedliche Blutgewinnung zurückzuführen sein.

Bei der hormonellen Langzeitbehandlung wurde z.T. auch ein Effekt auf das Körpergewicht registriert. ACTH und Adrenalin verringerten die Gewichtszunahme um durchschnittlich 10% bzw. 40%. Glucagon hatte keinen Einfluß auf das Gewicht.

Durch die Applikation von Insulin, Glucagon, Adrenalin und ACTH wurde kein signifikanter Effekt auf die KDH erzielt. Das Enzym zeigte zwar geringe Aktivitätsveränderungen. Die Aktivitätsunterschiede konnten aber statistisch nicht gesichert werden. Auch beim P-Enzym trat keine Aktivitätsveränderung auf.

3.2.5. Einfluß der Narkose auf die KDH- und P-Enzymaktivität

In einer letzten Versuchsreihe wurde der Einfluß der Narkose auf die KDH studiert. Es wurde eine tiefe Narkose angestrebt. In der Regel wurden 120 mg/kg Körpergewicht Nembutal intramuskulär verabreicht, um eine Narkosedauer von 60 Minuten zu erhalten. Da diese Menge nicht immer für eine tiefe Narkose ausreichte, wurde in diesen Fällen nach ca. 30 Minuten

erneut eine Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht gegeben. Im Verlauf der Narkose kam es zu einem Abfall des Blutzuckers um durchschnittlich 25%.

Abbildung 14 zeigt einen deutlichen Abfall der KDH im Herzen bei den Tieren, die eine mit der Narkose einhergehende Glucoseaufnahme aufweisen.

In drei Fällen blieb die Senkung der KDH-Aktivität aus. Bei diesen Tieren wurde jedoch auch keine Abnahme des Blutzuckers registriert. Möglicherweise befanden sich diese Tiere nicht in Vollnarkose.

Wurde gleichzeitig mit dem Narkotikum Adrenalin intramuskulär (1,5 mg/kg Körpergewicht) verabreicht, so war die Wirkung von Nembutal auf die KDH nicht mehr zu beobachten. Zwischen narkotisierten Tieren und Normaltieren war kein Unterschied in der KDH-Aktivität mehr festzustellen (Abb. 14).

Das P-Enzym veränderte auch in dieser Versuchsreihe seine Aktivität nicht.

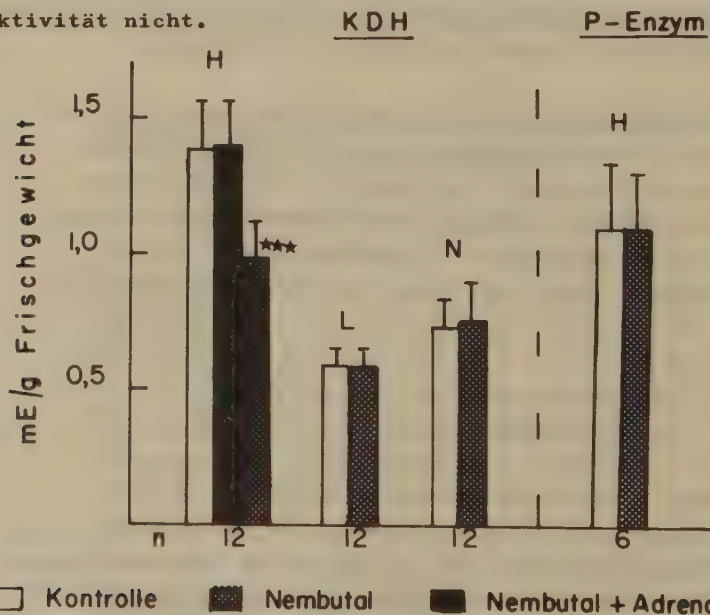


Abb. 14: Einfluß von Nembutal auf die KDH- und P-Enzym-Aktivität

***; $p < 0,001$ statistische Signifikanz nach dem Student t-Test; n=Anzahl der Versuche; H=Herz; L=Leber; N=Niere

4. DISKUSSION

4.1. Die Veränderung der KDH und des P-Enzyms während der Ontogenese

Die KDH katalysiert eine Reaktion im Citratzyklus. Aufgrund dieser Stellung ist sie an der Energiegewinnung über die Endoxidation mit beteiligt. Diese Funktion spiegelt sich auch in der Höhe der Aktivität in den Organen wider.

Im Herzen ist wegen der mechanischen Arbeitsleistung der Energiebedarf am größten. Hier hatte die KDH auch ihren höchsten Wert. In der Leber hingegen, einem Organ mit ausschließlicher Syntheseleistung, ist die Aktivität wesentlich niedriger.

Auch für das P-Enzym gilt diese Verteilung. Es fällt jedoch auf, daß die Leber selbst im Vergleich zur KDH eine äußerst geringe Aktivität aufweist. Dies wird deutlich, wenn man das Verhältnis KDH:P-Enzym in den einzelnen Organen vergleicht (Tab. 4). Während im Herzen, in der Niere und auch im Gehirn KDH und P-Enzym annähernd gleiche Aktivitätswerte aufweisen, ist die Aktivität der KDH in der Leber um etwa den 2,5 fachen Betrag höher als die des P-Enzyms. Dem P-Enzym kommt offensichtlich in diesem Organ keine große Bedeutung zu.

Diese Beobachtung ist nicht speziesbedingt. Ein Vergleich mit der Ratte zeigt, daß hier KDH und P-Enzym deutlich aktiver als beim Huhn sind. Das Verhältnis KDH:P-Enzym ist sogar noch ungünstiger. Die Tatsache, daß beim P-Enzym im Gegensatz zur KDH, der Überstand verwendet wurde, dürfte nicht entscheidend sein, da das P-Enzym im Homogenat keine höhere Aktivität aufweist. Im Rahmen dieser Arbeit

wurde nicht geklärt, in welcher Weise das Succinyl-CoA in der Leber weiter verstoffwechselt wird.

Eine deutliche Aktivitätszunahme erfährt die KDH im Herzen und in der Leber nach dem Schlupf. Die Zunahme im Herzen verläuft parallel mit dem P-Enzym, während in der Leber das P-Enzym keine Änderung erfährt. Dies unterstreicht erneut die geringe Funktion des P-Enzyms in diesem Organ.

Der KDH-Anstieg um die Zeit des Schlupfes ist allgemein als Ausdruck eines gesteigerten Energiebedarfs für die postnatalen Adaptationsprozesse zu betrachten. In postnatalen Stadium muß Energie für Thermoregulation, Bewegung und für den gesteigerten Wachstumsprozess zur Verfügung gestellt werden.

Da beim Übergang von der pränatalen in die postnatale Phase sich an der Nahrungsversorgung nichts ändert - das Küken ernährt sich auch in dieser Zeit von den Nahrungsvorräten aus dem Dottersack - muß der erhöhte postnatale Energiebedarf durch die gesteigerte Sauerstoffversorgung, die nach dem Schlupf aus dem Ei einsetzt, gedeckt werden. Es ist daher eine Steigerung der oxidativen Prozesse zu erwarten. Aufgrund der engen Koppelung von Atmungskette und Citratzyklus ist auch mit einer erhöhten Umsetzung im Citratzyklus zu rechnen. Die beobachtete Zunahme der KDH nach dem Schlupf ist vermutlich auf das erhöhte Sauerstoffangebot zuzückzuführen.

Daß die postnatale Phase eine erhöhte Oxidation in den Mitochondrien zur Folge hat, geht aus dem veränderten Redoxpotential hervor.

Aus Tabelle 5 ist ein conträrer Verlauf des Redox-äquivalentes im Cytoplasma und im Mitochondrium der Leber zu ersehen. Das Redoxpotential im Cyto-

plasma erhöht sich zugunsten des reduzierten Substrates, während es sich in den Mitochondrien erniedrigte. Die günstigere Sauerstoffversorgung nach dem Schlupf baut offensichtlich die Reduktionskapazität in den Lebermitochondrien ab.

Bei der kritischen Betrachtung der Konzentration von β -Hydroxybutyrat und Acetacetat fällt weiterhin auf, daß die Summe aus beiden Substraten bis zum 16. Tag nach dem Schlupf kontinuierlich abnimmt. Vor dem Schlupf liegen sie in einer unphysiologisch hohen Konzentration vor. Die Summe beträgt 1,04 Mol. Sie erniedrigt sich auf 0,39 Mol 16 Tage nach dem Schlupf.

Dieser Abfall spiegelt gleichzeitig die Veränderung der Futterzusammensetzung wider. Vor dem Schlupf und in den ersten Lebenstagen ernährt sich das Küken in ersten Linie aus den Fettreserven des Eies, während Kohlenhydrat in diesem Stadium der Entwicklung in keinem nennenswerten Ausmaß zur Verfügung stehen. Durch den erhöhten Fettsäureabbau entsteht eine hohe Acetyl-CoA Konzentration, die offensichtlich nicht weiter im Citratzyklus verstoffwechselt werden kann. Folgende Gründe könnten hierfür maßgeblich sein:

1. Das Enzymmuster der Atmungskette und des Citratzyklus ist zwar schon lange vor der Geburt angelegt (11,52), ihre Kapazität reicht jedoch für den Abbau des anfallenden Acetyl-CoAs nicht aus.
2. Eine Endoxidation von Acetyl-CoA in dem erforderlichen Ausmaß im Citratzyklus wird durch das geringe Sauerstoffangebot verhindert.
3. Auch bei einer entsprechenden Sauerstoffversorgung ist der vollständige Abbau von Fettsäuren über den Citratzyklus erschwert, wenn Fett den ausschließlichen Nahrungsträger darstellt. Dieser Zustand läßt sich mit der Stoffwechselsituation beim Diabetes mellitus

oder bei längerem Nahrungsentzug vergleichen.

In allen drei Fällen muß anfallendes Acetyl-CoA zu den sog. Ketonkörpern aufgebaut werden.

Es ist daher nicht überraschend, daß Küken in der perinatalen Phase einen erhöhten Ketonkörperspiegel aufweisen, der sich auch zwei Tage nach dem Schlupf noch nicht normalisiert hat. Erst wenn bei der Fütterung auf kohlenhydratreiche Nahrungsträger übergegangen wird, bildet sich eine physiologische Ketonkörperkonzentration aus, wie die Werte 16 Tage nach dem Schlupf zeigen.

4.2. Einfluß von Glutamat auf die Aktivität der KDH und des P-Enzyms

Glutamatapplikation führte zu einer Steigerung der KDH in der Leber.

Aufgrund der vorliegenden Literaturangaben (69, 85, 89) darf angenommen werden, daß Glutamat zum Ketoglutarat abgebaut wird. Eine Steigerung der KDH könnte entweder direkt durch Glutamat oder durch das Ketoglutarat, das beim Abbau von Glutamat entsteht, verursacht werden. Einer weiteren Erklärung bedarf die Verstoffwechselung des Glutamates im Embryo. Hier konnte eine Zunahme der KDH im Herzen, in der Leber und im Gehirn beobachtet werden. Gleichzeitig zeigte sich eine Veränderung des cytoplasmatischen Redoxäquivalentes zugunsten der reduzierten Form in der Leber.

Die Verstoffwechselung von Glutamat kann auch beim Kükenembryo bereits durch die Glutamat-Dehydrogenase oder die GOT vollzogen werden. Beide Enzyme sind pränatal in der Leber ausgebildet (71, 81, 82).

Die mit der Glutamatapplikation einhergehende Zunahme des Redoxpotentials im Cytoplasma setzt einen

oxidativen Schritt voraus, der sich auf der Stufe der Glutamat-Dehydrogenase oder im Citratzyklus abspielen kann. Die ausschließliche Umsetzung durch Transaminasen könnte nicht zu diesen Veränderungen führen, da hier kein oxidativer Vorgang abläuft.

Sowohl bei der Reaktion über die Glutamat-Dehydrogenase wie auch über den Citratzyklus waren Veränderungen des mitochondrialen Redoxpotentials zu erwarten, da beide Enzyme ausschließlich in diesem Kompartiment vorkommen.

Da das cytoplasmatische Redoxpotential sich vergrößerte, ist unter diesen Umständen ein Transport von Redox-äquivalenten, der über den Malat-Oxalacetatshuttle vollzogen werden konnte, durch die mitochondriale Membran zu postulieren.

Die Mitochondrien entledigen sich auf diese Weise der Reduktionsäquivalente und begünstigen möglicherweise damit die Umsetzung oxidabler Substanzen, die bei der mangelhaften Sauerstoffversorgung in der pränatalen Phase gehemmt sein sollte.

Die Zunahme des Redoxpotentials im Cytoplasma ist nicht durch einfache Reduktion von Pyruvat entstanden, sondern durch Neubildung von Lactat bei gleichbleibendem Pyruvatgehalt, da die Summe der beiden Substrate absolut zugenommen hat, Pyruvat aber keine Konzentrationsveränderung erfahren hat.

Als Stoffwechselweg bietet sich der Abbau von Glutamat zum Malat im Mitochondrium an. Das Malat wird dann in das Cytoplasma transportiert und dort zum Oxalacetat umgesetzt. Daraus kann sich dann entweder direkt über das Pyruvat oder über die Gluconeogenese und der anschließenden Glycolyse das Lactat ausbilden.

Der Weg über die Gluconeogenese ist nicht auszuschließen, da beim Schwein eine Zunahme der Glucose neben dem Lactat nach Gaben von Glutamat beobachtet werden konnte (85).

Außerdem spielt die Gluconeogenese im Gegensatz zum Säugetier in diesem Entwicklungsstadium wegen des geringen Kohlenhydrat-Reservoirs im Ei beim Küken eine wichtige Rolle (91).

Die Applikation von Glutamat ist jedoch auch für das Huhn innerhalb eines Grenzwertes nicht unproblematisch. Der ernährungsphysiologische Nutzen, vor allem auf den Gehirnstoffwechsel ist vielfach diskutiert worden (2, 3, 21, 56, 84). In den letzten Jahren häuften sich jedoch Befunde, wonach vor allem bei Jungtieren die Verabreichung von Glutamat sich toxisch auf die Gehirnzellen auswirken kann. So liegen Untersuchungen vor, die Gehirnschäden bei der Maus und bei der Ratte zeigen konnten (13, 57, 67). Hund und Esel hingegen scheinen gegen erhöhte Glutamatverabreichung resistenter zu sein (2, 3, 21, 63).

Hiervon kann das Huhn nicht ausgenommen werden. Sowohl im prä- wie auch im postnatalen Bereich war eine erhöhte Mortalität zu beobachten. Morphologische Studien des Gehirnes wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Es zeigte sich, daß auch im Gehirn die KDH auf Glutamat anspricht, obgleich der Abbau von Glutamat über die Glutamat-Dehydrogenase und den Citratzyklus in diesem Organ nicht den einzigen Stoffwechselweg darstellt.

Der Abbau über γ -Aminobuttersäure ist vor allem im Gehirn von Bedeutung (4, 8).

Ursächlich mit der Toxizität des Glutamates wurde eine Abnahme der γ -Aminobuttersäure im Gehirn in Verbindung gebracht. Da sich bei hohen Glutamatgaben Symptome zeigen, die auch bei Vitamin B₆-Mangel auftreten (65), ist nicht auszuschließen, daß Vitamin B₆ die Ursache der erniedrigten γ -Aminobuttersäure-

Konzentration darstellt. Vitamin B₆ stellt das Coenzym der Transaminasen dar.

Schließlich wird auch eine verminderte Glucoseaufnahme im Gehirn als toxische Wirkung von Glutamat diskutiert (19).

4.3. Einfluß des Futterentzuges auf die Aktivität der KDH und des P-Enzyms

Auch die Aktivitätssteigerung der KDH, die eine länger andauernde Hungerperiode auslöste, kann sinnvoll über den Aminosäurenstoffwechsel erklärt werden. Längerer Nahrungsentzug führt neben dem Abbau von Energiereserven wie Glykogen und Fett auch zu einer katabolen Stoffwechselsituation im Proteinstoffwechsel, die dem Aufbau von Kohlenhydraten dient. Der Proteinabbau hat eine Anreicherung von glucoplastischen Aminosäuren zur Folge, die z.T. auf der Stufe des Glutamates in den Citratzyklus einmünden. Hunger schafft also für die KDH eine der Applikation von Glutamat vergleichbare Situation. Eine Aktivierung der KDH ist unter diesem Aspekt auch zu erwarten. Die Tatsache, daß bei den Versuchen nur in der Leber, dem Organ mit vornehmlicher Gluconeogenese, ein Anstieg der KDH zu beobachten ist, unterstreicht die Aufgabe der KDH bei der Zuckerneubildung aus Aminosäuren.

Im Vergleich zu KDH zeigt die Pyruvat-Dehydrogenase eine umgekehrte Wirkung bei Futterentzug. Hunger verursacht bei der Pyruvat-Dehydrogenase eine Abnahme der Spontanaktivität, die nach dem bisherigen Kenntnisstand auf den Einfluß der erhöhten Fettsäuren zurückzuführen ist (86, 98). Wegen der gedrosselten Glycolyse im Hungerzustand wird dieses Enzym auch nicht in voller Aktivität benötigt. Der KDH hingegen wird im Hungerzustand vermehrt Substrat infolge der Einschleusung

von Aminosäuren in den Citratzyklus angeboten. Für dessen Abbau ist eine erhöhte KDH-Aktivität erforderlich. Damit unterscheiden sich KDH und Pyruvat-Dehydrogenase im Hinblick auf die Gluconeogenese grundlegend. Die KDH begünstigt die Entstehung einer Schlüsselsubstanz der Gluconeogenese, nämlich Oxalacetat. Die Pyruvat-Dehydrogenase hingegen baut ein Substrat ab, das als Ausgangsprodukt der Gluconeogenese dienen kann. Im Hungerzustand wirken sich die Inaktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase und die Aktivierung der KDH positiv auf die Gluconeogenese in der Leber aus.

4.4. Einfluß von Hormonen auf die Aktivität der KDH und des P-Enzyms

Die Applikation von Hormonen brachte keine signifikante Aktivitätsveränderung der beiden Enzyme.

Nur in einigen Fällen ist die Tendenz der Aktivitätsbeeinflussung angezeigt.

So könnte dem erhöhten Wert in der Leber nach Glucagongaben eine reelle Bedeutung zugrunde liegen.

Glucagon hat einen positiven Effekt auf die Gluconeogenese. Gleichzeitig stimuliert es auch die Proteolyse, die an einer erhöhten Harnstoffausscheidung verfolgt werden kann (15a). UI et al. (89) vertreten die Meinung, daß der gluconeogenetische Angriffspunkt von Glucagon auf der Stufe der Transaminierung und der oxidativen Decarboxylierung von Ketoglutarat anzusetzen ist.

Glucagon schafft demnach eine Stoffwechselsituation, wie sie auch im Hungerzustand gegeben ist: Es werden Aminosäuren zum Zweck der Gluconeogenese abgebaut.

Es ist freilich fraglich, ob Glucagon die Gluconeogenese aus Aminosäuren in dem Ausmaße stimuliert, wie dies nach Futterentzug erfolgt, da Glucagon Glucose in erster Linie über die Glycogenolyse zur Verfügung

stellt. Die ungewöhnlich hohe Blutzuckerkonzentration nach Glucagonapplikation (vgl. Tab. 8 u. 9) ist sicherlich auf diesem Weg entstanden. Möglicherweise ist der Anstieg der KDH nach Glucagonapplikation im Vergleich zu den Versuchen mit hungernden Tieren deswegen so gering ausgefallen, weil hier die Mobilisierung der Aminosäuren für die Gluconeogenese nicht in diesem Umfange stattfindet. Bei den Versuchen von UI et al. (vgl. S. 14) war dieser Gesichtspunkt von untergeordneter Bedeutung, da die Perfusionen mit exogenem Glutamat durchgeführt wurden. Ein ausreichend hohes Substratangebot wurde hier durch die Versuchsbedingung gewährleistet. Wird hingegen Glucagon allein verabreicht, dann reicht die damit erzielte Proteolyse in vivo wahrscheinlich nicht aus, um einen entsprechend hohen Glutamatspiegel auszubilden.

Diese Überlegungen gelten erst recht für Adrenalin, ACTH und Insulin, da diese Hormone entweder keinen Einfluß auf die Proteolyse oder im Falle des Insulins sogar einen anabolen Effekt auf den Eiweißstoffwechsel ausüben.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe decken sich mit denen von MACKERER et al. (51). Auch dort war kein Hinweis auf erhöhten Ketoglutaratabbau nach der Behandlung von Insulin und Glucagon gegeben. Ein Vergleich mit der Pyruvat-Dehydrogenase zeigt auch hier deutliche Unterschiede. Glucagon erniedrigt beim Huhn signifikant die Spontanaktivität der Pyruvat-Dehydrogenase im Herzen, in der Leber und in der Niere, während Adrenalin eine Erhöhung der Spontanaktivität bei dieser Tierspezies bewirkt (32). Ein ähnlicher Effekt des Adrenalins wurde auch beim Fettgewebe der Ratte beobachtet (34). Insulin führt bei der Ratte allgemein zu einer Erhöhung der Spontanaktivität (99).

4.5. Einfluß der Narkose auf die Aktivität der KDH und des P-Enzyms

Nembutal zeigte einen deutlichen Effekt auf die KDH im Herzen. Dieses Ergebnis ist insofern bemerkenswert, da es die einzige signifikante Abnahme der KDH in diesen Versuchen darstellt. Die Beobachtung läßt sich mit der Erniedrigung der Herzfrequenz, die bei Narkose allgemein auftritt, erklären. Als Folge davon erniedrigt sich auch der Energiebedarf. Dies macht sich in einem Aktivitätsrückgang der KDH bemerkbar.

Wurde durch gleichzeitige Verabreichung von Adrenalin die Herztätigkeit wieder angeregt (41), so blieb der Energieabfall aus. Eine Abnahme der KDH ist in diesem Falle nicht mehr zu beobachten.

Für die Regulierung der KDH können aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Die KDH kann durch Steigerung der Oxidationskapazität in den Mitochondrien, die beim Übergang von der prä- in die postnatale Phase des Kükens zu beobachten ist, in ihrer Aktivität gesteigert werden.
2. Stoffwechselumstellungen, bei denen in größerem Umfange Aminosäuren auf der Stufe des Glutamates in den Citratzyklus eingeschleust werden, ziehen ebenfalls eine Anhebung der KDH-Aktivität nach sich.
3. Die Regulierung der KDH erfolgt nicht durch dieselben Faktoren, die auch den Aktivitätsgrad der Pyruvat-Dehydrogenase bestimmen.
4. Veränderungen der KDH-Aktivität führen nicht gleichzeitig auch zu einer Veränderung der Reaktion, die das P-Enzym katalysiert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Verlauf der Ketoglutarat-Dehydrogenase während der Ontogenese verfolgt. Im Herzen und in der Leber erstrecken sich die Untersuchungen von der pränatalen Phase (3 Tage vor dem Schlupf) bis zur Legetätigkeit. Im Gehirn wurden die Werte in der perinatalen, in der Niere in der postnatalen Entwicklungsphase bestimmt.

Die Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität spiegelt den Energiebedarf der einzelnen Organe wider. Im Herzen waren die Werte am höchsten. Leber und Gehirn zeigten nur geringe Aktivitätswerte.

Beim Übergang von der prä- in die postnatale Periode erfährt die Ketoglutarat-Dehydrogenase im Herzen und in der Leber einen signifikanten Aktivitätsanstieg. In der Leber erniedrigte sich gleichzeitig das mitochondriale Redoxpotential, das über das β -Hydroxybutyrat/Acetacetat-Verhältnis ermittelt wurde. Die verbesserte Sauerstoffversorgung nach dem Schlupf erhöhte hier offensichtlich die Oxidationskapazität und begünstigte auf diese Weise die Umsetzung durch die Ketoglutarat-Dehydrogenase.

Längerer Futterentzug bewirkte in der Leber eine Aktivitätszunahme. Dies dürfte auf einen zunehmenden Abbau der Aminosäuren zurückzuführen sein, die auf der Stufe des Glutamates in den Citratzyklus eingeschleust und auf diesem Wege der Gluconeogenese zugeführt werden.

Der gleiche Effekt konnte durch intraperitoneale Verabreichung von Glutamat erzielt werden.

Eine Erhöhung der Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität war auch beim Embryo zu beobachten, wenn Glutamat in das Ei appliziert wurde.

Außer in der Leber trat hier der Anstieg im Herzen und im Gehirn auf. In der Leber führte die pränatale Applikation von Glutamat zu einer Erhöhung des cytoplasmatischen Redoxpotentials, das über das Lactat/Pyruvat-Verhältnis ermittelt wurde.

Die hormonelle Behandlung (Adrenalin, Insulin, ACTH und Glucagon) hatte keine signifikanten Veränderungen des Enzyms zur Folge.

Eine Abnahme der Ketoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität wurde in der Narkose erreicht. Hiervon war nur das Herz betroffen. Gleichzeitige Verabreichung von Adrenalin machte diesen Effekt wieder rückgängig.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit muß angenommen werden, daß die Regulierung der Ketoglutarat-Dehydrogenase nicht durch dieselben Parameter gesteuert wird, die einen Einfluß auf die Pyruvat-Dehydrogenase ausüben.

Die Succinat-Thiokinase, die wegen der engen Kopplung mit dem Ketoglutaratabbau mit untersucht wurde, wies, mit Ausnahme der Leber, in den übrigen Organen vergleichbare Aktivitätswerte auf.

Die Veränderungen der Ketoglutarat-Dehydrogenase korrelierten nicht mit denen der Succinat-Thiokinase. Lediglich beim Übergang von der prä- in die postnatale Phase war im Herzen die Zunahme der Aktivitätswerte bei beiden Enzymen annähernd gleich.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Abraham, R., Dougherty, W., Golberg, L. and Coulston, F.,
Exp. Mol. Pathol. 15 (1971), 43
- 2) Adamo, N. J. and Ratner, A.,
Science 169 (1970), 673
- 3) Arees, E. A. and Mayer J.,
Science 170 (1970), 549
- 4) Balázs, R. et al.,
Biochem. J. 116 (1970), 445
- 5) Bell, D. J.,
in: Pysiolog. and Biochem. of the Domestic Fowl
(Bell, D. J. ed) Academic Press, London. New York
2 (1971), 913
- 6) Bergmeyer, H. U.,
in: Methoden der Enzymatischen Analyse Bd. II (1970),
S. 2010 (Verlag Chemie Weinheim/Brgstr.)
- 7) Bergmeyer, H. U.,
in: Methoden der Enzymatischen Analyse Bd. II,
Verlag Chemie Weinheim/Brgstr., (1970), S. 1170
- 8) Bessmann, S. P., Rossen, J. and Layne, E. C.,
J. biol. Chem., 201 (1953), 385
- 9) Blass, J. P. et al.,
J. Biol. 131 (1973), 31
- 10) Bode, C. and Klingenberg, M.,
Biochem. Biophys. Acta. 84 (1964), 93
- 11) Brand, L. A. et al.,
J. Biol. Chem., 235 (1960), 2456
- 12) Bremer, J.,
Eur. J. Biochem. , 8 (1969), 535
- 13) Burde, R. M. et al.,
Nature. 233 (1971), 58
- 14) Bücher, T. et al.,
Angew. Chem., 70 (1958), 552
- 15) Cha, S. Cha C.-J. M. and Parkes, R. E.,
J. Biol. Chem., 242 (1967) 2582

- 15a) Cahill, G. F. et al.
J. Clin. Invest., 45 (1966), 1751
- 16) Chance, B.,
Science 120 (1954), 767
- 17) Chance, B. and Williamson, G. R.,
J. Biol. Chem., 217 (1955), 383
- 18) Charles, R. et al.,
Biochim. Biophys. Acta., 131 (1967), 29
- 19) Creasey, W. A. and Malawista, S. E.,
Biochem. Pharmacol., 20 (1971), 2917
- 20) De Haan, E. J. et al.,
Biochem. Biophys. Acta. 153 (1968), 98-112
- 21) Everly, J. L.,
Anal. Rec. 169 (1971), 312
- 22) Garland, P. B. et al.,
Nature 195 (1962), 381
- 23) Garland, P. B.,
Biochem. J. 92 (1964), 10C- 12
- 24) Garland P. B. et al.,
in: Citric Acid Cycle, Control and Compartmentation
(Löwenstein J. M. ed) 1972 S. 163-212
- 25) Gergely, J. et al.,
J. biol. Chem. 198 (1952), 323
- 26) Gibson and Nalbandov,
Am. J. Physiol. 211 (1965), 1352-1356
- 27) Hathaway, J. A. and Atkinson D. E.,
Biochem. Biophys. Commun. 20 (1965), 661
- 28) Hoerecker, B. L. et al.,
J. Biol. Chem. 175 (1948), 385
- 29) Hohorst, H. J. et al.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 4.(1961), 163
- 30) Hoppe-Seyler, Thierfelder ed.,
Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemisch-
en Analyse Bd. VI/Teil B, Springer Verlag, Berlin,
Heidelberg, New York, 1966, S. 41(35)

- 31) Hoppe-Seyler, Thierfelder ed.,
Handbuch der physiologisch- und pathologisch-
chemischen Analyse. Bd. VI Teil C, Springer-Verlag
Berlin, Heidelberg, New York 1966 S. 496
- 32) Hornig B.,
Dissertation in Vorbereitung.
- 33) Hunter Jr. F. E. and Nixon, W. S.,
J. Biol. Chem. 181 (1949) 67
- 34) Jungas, R. L.,
Metabolism, 20 (1971), 34
- 35) Karlson, P.,
Biochemie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1972 S. 193
- 36) Kaufman, S.,
J. Biol. Chem. 203 (1953), 869
- 37) Kaufman, S.,
in: Colowick-Kaplan, Meth. Enzymol. Bd. I (1955), 714
- 38) King, J.,
in: Methoden der enzymatischen Analyse
(H. U. Bergmeyer ed.) Bd. I, Verlag Chemie Weinheim/
Brgstr., (1970) S. 591-594
- 39) Klingenberg, M.,
In: Biological Structure and Function (T. W.
Goodwin and Linberg O. eds.) Vol. II, (1961),
227 Academic Press, New York
- 40) Klingenberg, M. et al.,
Biochem. C. 337 (1963), 120
- 41) Kushinsky, G., H. Lüllmann,
Kurzes Lehrbuch der Pharmakologie 2. Aufl.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964, S. 15
- 42) Krebs, A. J.,
Biol. J. 80 (1961), 225
- 43) Krebs, H. A.,
Vet. Record 78 (1966), 187
- 44) Krebs, H. A.,
in: Adv. Enzym Reg. 8 (1970) S. 342
(Weber. E. ed.) Pergamon Press

- 45) La Noüe et al.,
J. Biol. Chem. 247 (1972), 667
- 46) Langslow, D. R. and Hales, C. N.,
Lancet (1970), 1151
- 47) Langslow, D. R. and Hales, C. N.,
in: Physiol. and Biochem of the Domestic Fowl
(Bell, D. J. ed) Academic Press, London, New York
Vol. 1 B(1971), 536
- 48) Langslow, D. R. and Hales, C. N.,
J. Endocr. 43 (1969), 285
- 49) Lehninger, A. L.,
J. Biol. Chem. 164 (1946), 291
- 50) Linn, T. C. et al.,
Proc. nat. Acad. Sci. U.S.A. 62 (1969), 234
- 51) Mackerer, C. R., Mehlheim, M. A. and Tobin, R. B.,
Pro. Soc. Exp. Biol. Med. 139 (1972) 624
- 52) Mahler, H. R. et al.
J. Biol. Chem. 233 (1958) 770
- 53) Massey, V.,
Biochim. Biophys. Acta. 38 (1960), 447
- 54) Ochoa, S.,
J. Biol. Chem. 155 (1944), 87
- 55) Olney, J. W. and Sharpe, L. G.,
Science 166 (1969), 386
- 56) Olney, J. W. ,
Science 164 (1969), 719
- 57) Olney, J. W.,
J. Neuropathol. Exp. Neurol 28 (1969), 445
- 57) Olney, J. W. and Ho, O. L.,
Nature 227 (1970), 609
- 58) Olson, M. S. and Williamson, J. R.,
J. Biol. Chem. 246 (1971), 7794
- 59) Olson, M. S. et al.,
Biochim. Biophys. Acta. 247 (1972), 238
- 60) Olson, M. S. et al.,
J. Biol. Chem. 248 (1973), 1590

- 61) Olson, M. S. et al.,
J. Biol. Chem. 248 (1973), 1582
- 62) Orth, R. D. et al.,
Amer. Physiol. 198 (1960), 640
- 63) Oser, B. L. et al.,
Nature 229 (1971), 411
- 64) Portenhauser, R. and Wieland, O.,
Eur. J. Biochem. 31 (1972), 308
- 65) Prosky, L. and O'Dell, R. G.,
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 138 (1971), 517
- 66) Reed, L. J. et al.,
in: Energy Metabolism and the Regulation of Metabolic
Processes in Mitochondria (Mehlman, M. A. eds.)
Academic Press. New York. (1972), 253
- 67) Reynolds, W. A. et al.,
Science 172 (1971), 1342
- 68) Robinson, B. H. and Chappell, J. B.,
Biochim. Biophys. Res. Commun. 28 (1967), 249
- 69) Rost, J. and Rapoport, S. M.,
Eur. J. Biochem. 26 (1972), 106-
- 70) Rudman et al.,
Endocrinology 72 (1962), 527
- 71) Sanadi, D. R. et al.,
J. Biol. Chem. 197 (1952), 851
- 72) Sanadi, D. R. et al.
Biochim. Biophys. Acta. 14 (1954), 434
- 73) Sanadi, D. R. et al.,
J. Biol. Chem. 218 (1955), 505
- 74) Scheid, B. and Hirschberg, E.,
Am. J. Physiol. 213 (1967), 1173
- 75) Schmitt, c. M. and Williamson, J. R.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 32 (1971), 794
- 76) Shepherd, D. and Garland, P. B.,
Biochem. J. 114 (1969), 597
- 77) Skosey, J. L.,
J. Biol. Chem. 245 (1970), 510

- 78) Snere, P. A.,
Biochim. Biophys. Acta. 106 (1965), 445
- 79) Schmith, C. M. and Williamson, J. R.,
Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett. 18 (1971), 35
- 80) Solomon, J. B.,
Develop. Biol. I (1959), 182
- 81) Solomon, J. L. ,
Biochem. J. 66 (1957), 264
- 82) Solomon, J. B.,
Developmental Biology 1 (1959), 182
- 83) Söling, M-D. et al.,
Eur. J. Biochem. 37 (1973), 233
- 84) Stegink, L. D. et al.,
L. Nutr. 103(1973), 1138
- 85) Stegink, L., Filter, L. J., Jr. and Baker, G. L.,
J. Nutr. 103 (1973) 1146
- 86) Stucki, J. W., Brawand, F. and Walter, P.,
Eur. J. Biochem 27 (1972), 181
- 87) Tager, J. M. et al.,
in: Citric Acid Cycle, Control and Comoartimentation
(Loewenstein, J. M. ed.) Marcel Dekker, New York,
(1969), S. 213
- 88) Tubus, P. K.,
Biochim. Biophys. Acta. 70 (1963), 608
- 89) Ui, M., Exton, H. and Park C. P.,
J. Biol. Chem. 248 (1973), 5350
- 90) Vaughn, M.,
J. Biol. Chem. 236 (1961), 2196
- 91) Wallace, J. C. and Newsholme, E. A.,
Biochem. J. 104 (1967), 378
- 92) Weitzman,, P. D. J.,
Febs. Letters. 22 (1972), 323
- 93) Wieland, O. and Löffler, G.,
Life Sci. 2 (1962), 55
- 94) Wieland, O. and Löffler, G.,
Biochem. Z. 399 (1963), 204

- 95) Wieland, O. and Weiss, L.,
Biochim. Biophys. Res. Commun 13 (1963), 26
- 96) Wieland, O.,
in: Adv. Enzy. Reg. (Weber, G. ed.)
Pergamon Press 2 (1964), 85
- 97) Wieland, O.,
Advanc. Metab. Dis., 3. (1968), 1
- 98) Wieland, O. et al.,
Arch. of Biochem. and Biophysics. 143 (1971), 593
- 99) Williamson, J. R. et al.,
J. Biol. Chem. 246 (1971), 7632
- 100) Wittmann, J.,
persönliche Mitteilung
- 101) Wittmann, J.,
im Druck

Lebenslauf

Zur Person:

Chong-ja Chon, geb. Sung
geb. am 3. 12. 1942 in Nazu/Korea.
als Tochter des Studienrates
Sanghyo Sung und seiner Ehefrau
Zong-suk geb. La

Schul- und

Berufsausbildung

1948- 1954 Sabum-Busuk-Volksschule
in Kwangchu/Korea
1954- 1960 Chon-nam-Girls High School
in Kwangchu/Korea
1960 Reifeprüfung
1960-1961 Ewha-Frauenuniversität
in Seoul/Korea
1961 Einreise nach Deutschland
1961-1968 Hauswirtschaftliches
Praktikum in Köln und
Studienkolleg in Darmstadt
Absolvierung der Deutschen
Reifeprüfung
1968- 1972 Studium an der Justus-
Liebig-Universität in
Gießen
Hauswirtschafts- und
Ernährungswissenschaften.
Diplomerlangung
seit 1972 Doktorandin im Institut
für Ernährungsphysiologie
der Maxmilians-Universität
in München/Bayern.
(Institutsleiter:
Prof. Dr. Dr. Dr.h.c. Dr. hc
J. Brüggemann)

